Aus dem Institut für Mikrobiologie
der Universität Hohenheim
Direktor: Professor Dr. rer. nat. Franz Lingens

Mikrobieller Abbau von Amidopyrin und Phenazon

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Hartmut Blecher
aus Lingen

1980

Aus dem Institut für Mikrobiologie
der Universität Hohenheim
Direktor: Professor Dr. rer. nat. Franz Lingens

Mikrobieller Abbau von Amidopyrin und Phenazon

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Hartmut Blecher
aus Lingen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Haselmann

1.Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. F. Lingens

2.Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Ullmann

3.Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Remmer

Für Renate und David John

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Lingens am Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim durchgeführt.
Herrn Professor Dr. Lingens danke ich sehr für die Möglichkeit, in seinem Institut eine medizinische Doktorarbeit durchzuführen und anhand eines besonders interessanten Themas ein neues Arbeitsgebiet kennenzulernen.
Herrn Dr. W. Schäfer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Herrn Dr. D. Spitzner und Herrn Schwinger, beide Institut für Organische Chemie der Universität Hohenheim, danke ich für massenspektroskopische Untersuchungen.
Mein Dank gilt auch Herrn Dr. J. Nittinger, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim, für die Hilfe bei der Anfertigung lichtmikroskopischer Aufnahmen.
Allen Mitarbeitern im Institut für Mikrobiologie, besonders meiner Frau und Fräulein B. Ballhause, danke ich sehr für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	9
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Chemikalien	13
2.2.	Mikroorganismen	14
2.3.	Kulturmedien	14
2.4.	Anreicherung und Isolierung der Bakterienstämme	15
2.5.	Kultivierung der Stämme	16
2.6.	Überprüfung auf Kontaminationen	17
2.7.	Charakterisierung der isolierten Stämme	17
2.7.1.	Physiologische Tests	17
2.7.2.	Nachweis der Vitamin B_{12} - Abhängigkeit	20
2.7.3.	Antibiotika Tests	21
2.8.	Nachweis von Brenzkatechinderivaten	22
2.9.	Dünnschichtchromatographie	23
2.10.	Elektronenmikroskopie	23
2.11.	Geräte	23
3.	Ergebnisse	25
3.1.	Anreicherung und Isolierung der Bakterienstämme	25
3.2.	Morphologische Charakterisierung	27
3.3.	Physiologische Charakterisierung	44
3.4.	Antibiotika-Empfindlichkeit	46
3.5.	Wachstumsansprüche und osmotische Empfindlichkeit	48
3.6.	Abbau von Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon	52
3.6.1.	Wachstumsversuche, Wachstumskurven, DC	52
3.6.2.	Resting cells-Versuche mit Stamm N	55
3.6.3.	Akkumulation des Brenzkatechinderivats von Chloridazon	55
3.7.	Aufklärung des Pyramidon®-Abbauwegs	56
3.7.1.	Isolierung des Brenzkatechinderivats von Pyramidon®	57

		Seite
3.7.2.	Isolierung des entphenylierten Heterozyklus von Pyramidon®	61
3.8.	Abbau von Aminoantipyrin	64
3.9.	Suche nach weiteren, wachstumswirksamen Substraten	67
3.10.	Metabolisierung von Metamitron	70
3.11.	Abbau von Biphenyl	73
3.11.1.	Charakterisierung des Metaspaltprodukts von Biphenyl	75
3.11.2.	Isolierung von Benzoesäure	76
3.12.	Wachstumsversuche mit Phenylalanin	77
3.13.	Wachstumsversuche mit L-Tyrosin	84
3.14.	Abbau von Phenylpyruvat	84
3.15.	Wachstumsversuche mit Zimtsäure und Mandelsäure - Abbau von Zimtsäure	85
3.16.	Wachstumsversuche mit Phenylessigsäure und Benzoesäure	88
4.	Diskussion	89
4.1.	Isolierung und Charakterisierung der Stämme	89
4.2.	Systematische Klassifizierung	90
4.3.	Wachstumsansprüche	91
4.4.	Abbauwege	92
5.	Zusammenfassung	95
6.	Literaturverzeichnis	97
	Anhang	100
	Lebenslauf	103

Einleitung

Im Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim werden seit einigen Jahren unter der Leitung von Herrn Professor Dr. F. Lingens Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau des Herbizids Chloridazon (5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3(2H)-pyridazinon) durchgeführt. Chloridazon (früher "Pyrazon" genannt) ist ein selektives Rübenherbizid und wird als formulierte Ware unter der Bezeichnung Pyramin® gehandelt.

Bakterien mit der Fähigkeit zum Chloridazon-Abbau wurden erstmals in den Jahren 1967-1970 von ENGVILD und JENSEN (1969) und von FRÖHNER, OLTMANNS und LINGENS (1970) unabhängig voneinander isoliert und beschrieben. In den darauf folgenden Jahren wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim nachgewiesen, daß sich in aller Welt (Deutschland, Ecuador, USA, Kenia) aus Erde Bakterien in Reinkultur isolieren lassen, die mit Chloridazon als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (LINGENS et al., 1977). Bei der Isolierung spielte es keine Rolle, ob die verwendeten Böden in der Natur vorher je mit Chloridazon behandelt worden waren.

Bei sämtlichen Anreicherungsverfahren mit Chloridazon wurde immer wieder dieselbe Art von Bakterien gefunden (LINGENS et al., 1977), die aber noch nicht taxonomisch eingeordnet werden konnte.

Diese Bakterienstämme haben - mit einer Ausnahme - auch die Fähigkeit, auf Antipyrin®* zu wachsen. Zum Teil wird auch Pyramidon®* metabolisiert.

Alle über Chloridazon isolierten Stämme bauen Chloridazon in derselben Weise ab (Abb.1) (DE FRENNE et al., 1973; HAUG et al., 1973; BLOBEL et al., 1976 a+b). Besonders bemerkenswert ist, daß lediglich der Phenylrest von den Bakterien als Kohlenstoffquelle verwertet wird, während der Heterozyklus nicht abgebaut wird.

* siehe Fußnote S.12

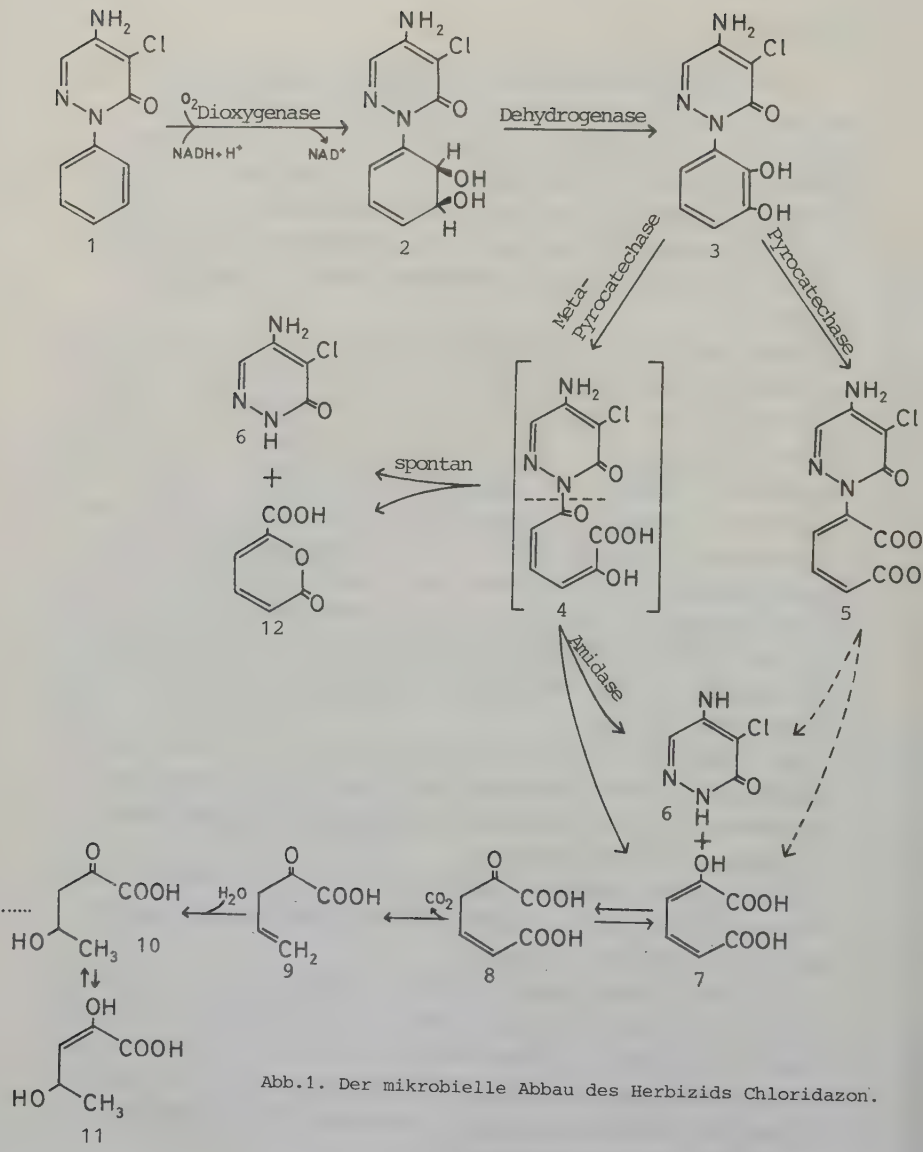
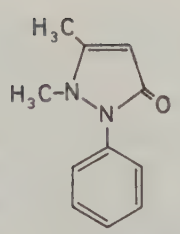
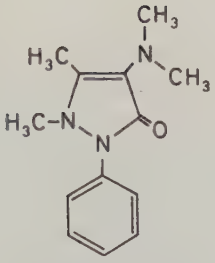


Abb.1. Der mikrobielle Abbau des Herbizids Chloridazon.



Antipyrin®



Pyramidon®

Legende zu Abb.1.

		Literatur
1	Chloridazon (5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3(2H)-pyridazinon)	
2	Dihydro-dihydroxy-Derivat von Chloridazon (5-Amino-4-chlor-2-(2,3-cis-dihydroxy-cyclohexa-4,6-dien-1-yl)-3(2H)-pyridazinon)	DE FRENNE et al., 1973
3	Brenzkatechinderivat von Chloridazon (5-Amino-4-chlor-2-(2,3-dihydroxyphen-1-yl)-3(2H)-pyridazinon)	HAUG et al., 1973
4	Metaspaltprodukt (2-Hydroxy-6-oxo-6-(4-amino-5-chlor-6-oxo-pyridazin-1-yl)-hexa-2,4-diensäure)	MÜLLER et al., 1977
5	Orthospaltprodukt (2-(5-Amino-4-chlor-3-oxo-2,3-dihydro-2-pyridazino)-cis,cis-muconsäure)	DE FRENNE et al., 1973 BLOBEL et al., 1976a
6	Chloridazon-Heterozyklus (5-Amino-4-chlor-3(2H)-pyridazinon)	DE FRENNE et al., 1973
7	2-Hydroxymuconsäure	BLOBEL et al., 1976b
8	4-Oxalocrotonsäure	BLOBEL et al., 1976b
9	2-Keto-4-en-valeriansäure	BLOBEL et al., 1976b
10	2-Keto-4-hydroxyvaleriansäure	BLOBEL et al., 1976b
11	2,4-Dihydroxy-2-en-valeriansäure	BLOBEL et al., 1976b
12	2-Pyron-6-carbonsäure	DE FRENNE et al., 1973
Enzyme:	Dioxygenase	SAUBER et al., 1977a
	Dehydrogenase	EBERSPÄCHER und LINGENS, 1978
	Pyrocatechase	BLOBEL et al., 1976a
	Metapyrocatechase	MÜLLER et al., 1977
	Amidase	MÜLLER et al., 1977

Die Metabolisierung von Antipyrin® verläuft völlig analog zum Abbauweg des Chloridazons (SAUBER et al., 1977b).

Es stellte sich nun die Frage, ob auch Antipyrin® und Pyramidon® nur von dieser einen Bakterienart als Kohlenstoffquelle genützt werden können, oder ob sich auch andere Mikroorganismen isolieren lassen, die Antipyrin® oder Pyramidon® - eventuell auch auf anderem Abbauweg - metabolisieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Antipyrin® und Pyramidon® als Selektionsmittel einzusetzen, Mikroorganismen mit der Fähigkeit zum Antipyrin®- oder Pyramidon®-abbau in Reinkultur zu isolieren und diese Stämme mit den bisher über Chloridazon isolierten Stämmen zu vergleichen.

Die internationalen Bezeichnungen der bekannten Handelsnamen Pyramidon® und Antipyrin® sind Amidopyrin für Pyramidon® und Phenazon für Antipyrin®.
Im weiteren Verlauf der Arbeit werden lediglich die Handelsnamen aufgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden von den angegebenen Quellen bezogen:

Pyramidon®, Biphenyl, L-Phenylalanin, D-Phenylalanin, DL-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Cystein, Strychnin, Natriumbenzoat, Naphthol-(1), Aesculin, Phenolrot, Casein nach Hammarsten, Gelatine von Merck AG, Darmstadt, West-Deutschland.

4-Aminoantipyrin, Isatin, 1-Methylisatin, 2-Indolinon, 2-Benzoxazolinon, 2H-1,4-Benzothiazin-3(4H)-on von Ega-Chemie, Steinheim, West-Deutschland.

Metamitron von Bayer AG, Leverkusen, West-Deutschland.

Phenylessigsäure, L-Lysin, N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid, Phenylpyruvat von Fluka AG, Buchs, Schweiz.

Antipyrin® von Riedel-de Haen, Seelze-Hannover, West-Deutschland.

Bu 1014 von Nordmark-Werke, Hamburg, West-Deutschland.

Hefeextrakt, Pepton von Oxoid, London, Großbritannien.

Nutrient broth, Agar-Agar von Difco, Detroit, USA.

Chloridazon wurde als Rohprodukt von der Badischen Anilin- & Soda-Fabrik, Ludwigshafen, West-Deutschland, bezogen. Vor der Verwendung wurde das Produkt in zwei Arbeitsgängen gereinigt: 1.Waschen mit Aceton. 2.Umkristallisieren aus Wasser; dazu wurden 4 g Chloridazon in 1l Wasser 10 Minuten lang bei 121°C autoklaviert und die Lösung nach dem Abkühlen auf 90-100°C filtriert. Das Filtrat wurde zum Auskristallisieren 2 Tage bei 4°C aufbewahrt. Diese Methode erlaubte es, ein Volumen von 20-30 l in einem Arbeitsgang aufzuarbeiten.

Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten organischen und anorganischen Chemikalien waren von Reinheitsgrad "pro analysi".

2.2. Mikroorganismen

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme (außer den neu isolierten Stämmen) gehören zur Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie der Universität Hohenheim.

2.3. Kulturmedien

Minimalmedium (Mineralsalzmedium): KH_2PO_4 0,875 g, K_2HPO_4 0,125 g, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ 0,5 g, NaCl 0,1 g, $CaCl_2 \times 6\ H_2O$ 0,1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 g, H_3BO_3 0,5 g, $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ 0,04 mg, KJ 0,1 mg, $FeCl_3 \times 6\ H_2O$ 0,2 mg, $MnSO_4 \times 4\ H_2O$ 0,4 mg, $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$ 0,4 mg, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$ 0,2 mg, Vitamin B_{12} 0,03 mg, deionisiertes Wasser 1000 ml. Das Medium wird mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,8-7,0 eingestellt.

Dem Mineralsalzmedium wurde die jeweilige Kohlenstoffquelle in einer Konzentration zwischen 0,01 und 0,1% (g/ml) zugesetzt.

Komplettmedium A: Hefeextrakt 5 g, Pepton 5 g, Fleischextrakt 3 g, NaCl 5 g, deionisiertes Wasser 1000 ml.

Komplettmedium B: Hefeextrakt 1 g, Pepton 1 g, deionisiertes Wasser 1000 ml.

Medium C: Hefeextrakt 1 g, Pepton 1 g, Antipyrin® oder Chloridazon 0,5 g, Mineralsalzmedium (pH 7,0) 1000 ml.

Medium D: Hefeextrakt 2,5 g, Pepton 2,5 g, Fleischextrakt 1,5 g, NaCl 2,5 g, Antipyrin® oder Chloridazon 1,0 g, deionisiertes Wasser 1000 ml.

Erdextrakt: 900 ml Erde und 900 ml deionisiertes Wasser werden zusammen auf 80°C erhitzt, durch ein Faltenfilter filtriert und das immer noch trübe Filtrat zentrifugiert (Stock-Zentrifuge, Stufe 6). Der klare Überstand wird mit deionisiertem Wasser auf 2 l aufgefüllt. Darin werden 0,5 g KH_2PO_4, 1,0 g K_2HPO_4 und 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$ gelöst (pH 7,2).

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medien jeweils 1,8% Agar (Difco) zugesetzt.

Sämtliche Kulturmedien wurden 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Hitzelabile (z.B. Metamitron) und flüchtige Stoffe (z.B. Biphenyl) wurden dem sterilen Medium unter sterilen Bedingungen nach Abkühlung zugesetzt.

.4. Anreicherung und Isolierung der Bakterienstämme

1.Verfahren: Anreicherung über Erdkulturen

34 verschiedene Erdproben (à 300 g) wurden in Plastikblumentöpfen mit Antipyrin®, Pyramidon® oder Chloridazon (jeweils 100 mg) vermischt und bei 30°C mit deionisiertem Wasser feucht gehalten. Alle 4 Wochen wurden auf die Erdproben erneut 50 mg der jeweiligen Substanz aufgestreut.

Nach einer Inkubationszeit von 6 Monaten wurde aus allen Töpfen 5 g Erde entnommen und in 250 ml-Erlenmeyerkolben in jeweils 100 ml Mineralsalzmedium suspendiert. Diese Kolben enthielten Antipyrin®, Pyramidon® oder Chloridazon jeweils als einzige Kohlenstoffquelle. Im Falle des Chloridazons und Antipyrins® betrug die Substratkonzentration 0,05%, im Falle des Pyramidons® nur 0,03%, da Pyramidon in höheren Konzentrationen hemmend wirkt.

Die Flüssigkulturen wurden etwa 2 Wochen bei 30°C geschüttelt und dann auf ein frisches Medium mit derselben Zusammensetzung überimpft. Nach etwa 5 Transfers, die zuletzt in immer kürzeren Abständen durchgeführt werden konnten, wurde die Kulturflüssigkeit auf Agarplatten ausgestrichen, welche die oben genannten Medien in verfestigter Form enthielten. Die Platten mußten 3-4 Wochen inkubiert werden, bis Einzelkolonien zu sehen waren. Durch mehrmaliges Überimpfen dieser Einzelkolonien wurden die Stämme gereinigt.

2. Verfahren: Direkte Isolierung ohne Anreicherungskultur

Um die langwierige Anreicherung der Bakterien in den Blumentöpfen zu umgehen und um möglichst steril arbeiten zu können, wurde folgendes verkürzte Verfahren - allerdings ohne Erfolg - durchgeführt: In 2 l-Erlenmeyerkolben wurde je 1 l Antipyrin®- bzw. Pyramidon®-Mineralsalzmedium (Substratkonzentration 0,05%) mit 50-100 g unbehandelter Erde auf der Schüttelmaschine 6 Wochen lang bei 30°C inkubiert. Dann wurde jeweils 5 ml Medium auf 250 ml-Erlenmeyerkolben überimpft. Als nach 2 Transfers in keinem der Kolben Abbau festgestellt werden konnte, wurde diese Versuchsreihe eingestellt.

Die Beurteilung des Abbaus erfolgte sowohl durch Messung der Bakteriendichte als auch durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Kulturflüssigkeit.

2.5. Kultivierung der Stämme

Stämme, die über Antipyrin® oder Chloridazon selektioniert worden waren, wurden alle 10 Tage auf Antipyrin®- bzw. Chloridazon-Mineralsalzagar überimpft. Diejenigen Stämme, die mit Pyramidon® isoliert worden waren, wurden abwechselnd auf Pyramidon®- und Antipyrin®-Platten gezüchtet. Diese Methode wurde gewählt, weil sich die Bakterien nicht unbegrenzt auf Pyramidon®-Medien überimpfen lassen. Durch den alternierenden Transfer über Antipyrin® kann das Absterben der Kulturen verhindert werden. Es wurde nicht in Betracht gezogen, die über Pyramidon® isolierten Kulturen ausschließlich auf Antipyrin® weiterzuzüchten, da auf diesem Medium die Fähigkeit zum Pyramidon®abbau verloren gehen könnte.

Sämtliche Kulturen wurden nach dem Überimpfen 4 Tage bei 30°C inkubiert und dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

.6. Überprüfung auf Kontaminationen

Da sämtliche bisher über Chloridazon, Antipyrin® oder Pyramidon® selektionierten Bakterienstämme nicht auf dem oben angegebenen Komplettmedium A wachsen, kann durch einen Ausstrich auf dieses Medium die Reinheit eines Stammes überprüft werden. Kontaminationen wachsen normalerweise auf diesem Komplettmedium und können so auf einfache Weise erkannt werden.

.7. Charakterisierung der isolierten Stämme

.7.1. Physiologische Tests

Untersuchungen zur Morphologie und Physiologie wurden in Anlehnung an das Manual of Microbiological Methods (1957) durchgeführt. Die einzelnen Versuche wurden entsprechend den speziellen Ansprüchen dieser Bakterien geändert. Für Stamm N wurde anstelle von Antipyrin® jeweils Chloridazon verwendet. Wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, wurden alle Versuche bei 30°C inkubiert.

Katalase- und Oxidase-Test

Die Stämme wurden sowohl auf Agarplatten mit Antipyrin®-Mineralsalzmedium als auch auf Platten mit Komplettmedium B gezüchtet. Im Katalase Test wurde nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen Wasserstoffperoxid-Lösung (3%) auf die Ausstriche getropft.

Zur Überprüfung der Cytochrom-Oxidase wurde nach 5 bzw. nach 20 Tagen folgendes Reagenz aufgetropft:
Lösung A: 1% Lösung von Naphthol-(1) in Äthanol (96%)
Lösung B: 1% Lösung von N,N,N´,N´-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid in Wasser
Lösung A und B werden kurz vor Gebrauch hergestellt und im Verhältnis 2 + 3 gemischt. Das gebrauchsfertige Reagenz wird auf den Ausstrich aufgetropft.

Fermentation von Kohlenhydraten

Die Fermentationsleistung wurde mit Hilfe des "Api-Systems" (Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH, Lich, West-Deutschland) überprüft. Das in dieser Arbeit verwendete "Api 50 E Research System" besteht aus einer Kunststoffplatte mit 50 Röhrchen (Füllvolumen 120 µl). In 10 dieser Röhrchen können verschiedene biochemische Tests durchgeführt werden. (Diese Tests sind wegen der speziellen Ansprüche der verwendeten Bakterien nur als Vorversuche zu werten.) Die übrigen 40 Röhrchen enthalten diverse Kohlenhydrate und außerdem jeweils Phenolrot als Indikator. In diese Röhrchen müssen die Bakterien in einer dünnen Suspension eingefüllt werden. Als Suspensionsflüssigkeit soll ein Medium verwendet werden, das den Bakterien ein gutes Wachstum ermöglicht und einen pH-Wert von 7,4 hat. Für diesen Zweck wurde folgendes Medium entwickelt: Das unter 2.3. beschriebene Minimalmedium wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Dann wird dem Medium 0,5 g Antipyrin®, 1,0 g Hefeextrakt und 1,0 g Pepton / Liter zugesetzt. Der pH-Wert dieses Mediums bleibt während des Züchtens weitgehend konstant (Abweichungen maximal $\pm$ 0,2).

Urease-Test

Zur Untersuchung auf Urease wurden die Stämme auf Petrischalen ausgestrichen, die Medium C enthielten (pH 6,8; der Gehalt an $(NH_4)_2SO_4$ wurde auf 0,01% reduziert). Als Indikator waren 12 mg Phenolrot /l enthalten. Nach dem Sterilisieren wurde dem Medium 1,0 g Harnstoff /l zugesetzt.

Voges-Proskauer- und Methylrot-Test

Beide Untersuchungen wurden in Kapsenbergröhrchen durchgeführt, die jeweils 5 ml des folgenden Mediums enthielten: Hefeextrakt 1,0 g, Pepton 1,0 g, Mineralsalzmedium (pH 7,0) 1000 ml. Nach dem Sterilisieren wurde dem Medium 2,0 g

Glucose /l zugesetzt.

Zur Untersuchung der Voges-Proskauer-Reaktion wurde zu 1 ml Kulturflüssigkeit 0,6 ml 5%ige Naphthol-(1)-Lösung (in Äthanol 96%) und 0,2 ml 40%ige Kalilauge gegeben.

Stärke-Hydrolyse

Die Stämme wurden auf Agarplatten ausgestrichen, die 0,05% Stärke (gelöst in Medium C) enthielten. Nach einer Inkubationszeit von 3 Wochen wurden die Platten mit Lugol'scher Lösung übergossen.

Gelatine-Hydrolyse

Die Stämme wurden im Stich auf Kapsenbergröhrchen überimpft. Diese enthielten Medium C, das mit 12% Gelatine verfestigt war.

Zellulose-Hydrolyse

Die Stämme wurden in Kapsenbergröhrchen inkubiert. Diese enthielten jeweils 5 ml Medium C und einen Filterpapierstreifen, der zur Hälfte in das flüssige Medium eingetaucht war.

Casein-Hydrolyse

Die Stämme wurden auf Agarplatten ausgestrichen, die 0,2% Casein (gelöst in Medium C) enthielten. Nach einer Inkubationszeit von 5 Wochen wurden die Platten mit 20%iger Essigsäure übergossen.

H_2S-Produktion

Der Test wurde auf Agarplatten durchgeführt, die folgendes Medium enthielten: Ammoniumeisen(III)-citrat 1,0 g, $Na_2S_2O_3$ oder L-Cystein 2,0 g, Medium C 1000 ml.

Indol-Test

Die Stämme wurden in 100 ml-Erlenmeyerkolben gezüchtet, die folgendes Medium enthielten: Hefeextrakt 0,5 g, Pepton 0,5 g, Antipyrin® 0,5 g, L-Tryptophan 0,5 g, Minimalmedium 1000 ml.

Zum Nachweis von Indol wurde folgendes Reagenz ver-

wendet: p-Dimethylamino-benzaldehyd 5,0 g, Amylalkohol 75 ml, conc. HCl 25 ml.

Nitritbildung

Die Stämme wurden jeweils in 5 ml Medium C inkubiert, das anstelle von $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 g $NaNO_3$ /l enthielt.

Zum Nitritnachweis wurden folgende Reagenzien verwendet: A: 0,5 g Sulfanilsäure werden in 15 ml 5 N Essigsäure gelöst. B: 0,1 g α-Naphthylamin werden in 20 ml kochendem Wasser gelöst und 130 ml 5 N Essigsäure hinzugefügt. Durchführung: Zu 2 ml Kulturmedium werden 0,1 ml A gegeben, auf 75°C erwärmt und dann B tropfenweise hinzugefügt. Rot= positiver Ausfall, gelb= sehr stark positiver Ausfall der Reaktion.

Fluoreszierende Pigmente

Die Stämme wurden auf Agarplatten ausgestrichen, die ein modifiziertes King B-Medium (KING et al., 1954) enthielten: Hefeextrakt 1,0 g, Pepton 1,0 g, Glycerin 1,0 g, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ 1,0 g, $K_3PO_4 \times 7\ H_2O$ 1,8 g, deionisiertes Wasser 1000 ml. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Überprüfung der Sauerstoffansprüche

Die Stämme wurden in Kapsenbergröhrchen inkubiert. Diese enthielten Antipyrin®-Mineralsalzmedium, dem als Stickstoffquelle entweder $(NH_4)_2SO_4$ oder $NaNO_3$ zugesetzt worden war. Die Kulturen wurden sofort nach dem Animpfen mit sterilem, flüssigem Paraffin überschichtet.

2.7.2. Nachweis der Vitamin B_{12} - Abhängigkeit

Die Stämme wurden in Antipyrin®-Mineralsalzmedium (Stamm N in Chloridazon-Mineralsalzmedium) ohne Vitamin B_{12} - Zusatz angezüchtet und mehrmals auf frisches Medium derselben Zusammensetzung transferiert. Als nach 2-3 Transfers die meisten Stämme kein sichtbares Wachstum mehr

zeigten, wurde 1 ml des letzten, kaum gewachsenen Transfers auf ein Medium mit Vitamin B_{12}-Zusatz überimpft. Nach einer Woche waren auf diesem Medium wieder sämtliche Stämme gewachsen.

2.7.3. Antibiotika-Tests

Die Stämme wurden auf Antipyrin®- bzw. Chloridazon-Mineralsalzagar vorgezüchtet. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Tagen wurden 2 Impfösen Zellmaterial in 2 ml Mineralsalzmedium (ohne Substrat) suspendiert und dann auf Antipyrin®- bzw. Chloridazon-Mineralsalzagar möglichst gleichmäßig ausplattiert. Die plattierten Petrischalen wurden 12 Stunden bei 30°C vorinkubiert und erst dann die Antibiotika-Plättchen aufgelegt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 4 Tagen wurden die Durchmesser der Hemmhöfe gemessen und verglichen.

Verwendet wurden Multodisks und Einzelplättchen der Firma Oxoid, London, Großbritannien.

Multodisks Code S 1:	Chloramphenicol	10 µg
	Erythromycin	10 µg
	Sulfafurazol	100 µg
	Cloxacillin	5 µg
	Penicillin	1,5 U
	Ampicillin	2 µg
	Streptomycin	10 µg
	Tetracyclin	10 µg
Multodisks Code S 4:	Cephaloridin	5 µg
	Fusidinsäure	10 µg
	Lincomycin	2 µg
	Novobiocin	5 µg
	Methicillin	10 µg
	Penicillin	1,5 U
	Ampicillin	2 µg
	Tetracyclin	10 µg

Multodisks Code 30-9C:	Methicillin	10 µg
	Colistinsulfat	10 µg
	Fusidinsäure	10 µg
	Kanamycin	5 µg
	Neomycin	10 µg
	Novobiocin	5 µg
	Cloxacillin	5 µg
	Ampicillin	2 µg
Einzelplättchen:	Ampicillin	2/10/25 µg
	Bacitracin	10 µg
	Chloramphenicol	10/30/50 µg
	Colistinsulfat	5 µg
	Novobiocin	5 µg
	Penicillin	2/5/10 U
	Streptomycin	10/25 µg
	Tetracyclin	10 µg

2.8. Nachweis von Brenzkatechinderivaten (CAT-Test)

Der Nachweis von Brenzkatechin und Brenzkatechinderivaten wurde nach der Vorschrift von ARNOW (1937) durchgeführt.

CAT-Reagenz: $NaNO_2$ 10 g, Na_2MoO_4 10 g, demineralisiertes Wasser ad 100 ml.

Durchführung des Tests: 1 (Volumen)-Teil Testlösung, 1 Teil 0,5 N HCl und 1 Teil CAT-Reagenz werden gemischt. Ist Brenzkatechin (oder ein entsprechendes Derivat) in der Testlösung enthalten, so färbt sich der Ansatz gelb. Nach Zusatz von 1 Teil 1 N NaOH schlägt die Gelbfärbung nach Rot um.

2.9. Dünnschichtchromatographie (DC)

DC wurde auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (Schichtdicke 0,25 mm auf Glas) der Merck AG, Darmstadt, West-Deutschland, durchgeführt.

Laufmittelsystem: Chloroform-Äthanol 96%-Aceton

74 : 1 : 25

Ehrlichs Reagenz zum Besprühen der Platten: Lösung von 3,6 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 18 ml konz HCl, ad 100 ml Äthanol 96%.

2.10. Elektronenmikroskopie

Kollodium-Trägerhäutchen wurden selbst angefertigt und auf Kupfernetze aufgezogen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, in deionisiertem Wasser suspendiert und anschließend auf die Kupfernetze aufgebracht. Nach dem Eintrocknen erfolgte Schrägbedampfung mit Pt/Ir.

Die Aufnahmen wurden mit dem Siemens Elektronenmikroskop, Elmiskop I, 40-100 KV, angefertigt.

2.11. Geräte

Das bakterielle Wachstum in Flüssigkulturen wurde durch Trübungsmessung im Eppendorf-Photometer 1101 M der Eppendorf-Gerätebau, Hamburg, West-Deutschland, verfolgt. (Filter 400-600 nm). (Messung im Reagenzglas.)

Sämtliche Zentrifugationen erfolgten in einer gekühlten Beckman J-21-Centrifuge.

Die Fraktionierung von Säulentrennungen wurde mit dem Ultrorac und Uvicord II der LKB-Produkter AB, Bromma, Schweden, durchgeführt.

Die Schmelzpunktsbestimmungen wurden mit einem Büchi-Kapillar-Schmelzpunktapparat durchgeführt.

UV-Spektren wurden mit dem DMR-21-Photometer von Carl Zeiss Optische Werke, Oberkochen, West-Deutschland, registriert.

IR-Spektren wurden mit dem Spektrometer von Ernst Leitz Optische Werke, Wetzlar, West-Deutschland, aufgenommen. Eine Mikroeinrichtung ermöglichte mit diesem Gerät die Messung von etwa 20 µg Substanz (in KBr).

Die Massenspektren wurden mit einem CH-7-Spektrometer (Martinsried) und einem Varian MAT 311 (Stuttgart-Hohenheim), beide von Varian, Bremen, West-Deutschland, aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Anreicherung und Isolierung der Bakterienstämme

Nach dem unter 2.4. beschriebenen 1. Anreicherungsverfahren wurden aus 34 Erdproben insgesamt 13 Stämme isoliert.

Die Isolierung über Antipyrin® und Chloridazon gelang ohne größere Schwierigkeiten. Dagegen war die Selektionierung über Pyramidon® mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Allein die Reinigung der Stämme durch wiederholtes Ausstreichen auf Petrischalen nahm etwa 1 Jahr in Anspruch. Obwohl in Flüssigkulturen eindeutiges Wachstum erfolgte und 30 mg Pyramidon® / 100 ml Medium in 4 Tagen abgebaut wurden, bildeten diese Stämme auf Pyramidon®-Platten meistens keine Einzelkolonien. Bei 4 Stämmen gelang es schließlich doch, eine Einzelkolonie, die in der Nähe eines dickeren Ausstrichs gewachsen war, zu überimpfen und die Stämme so von anderen Mikroorganismen zu reinigen.

Bei mehreren Stämmen, bei denen auch nach 1 Jahr noch keine Einzelkolonie rein überimpft werden konnte, wurde ein weiteres Verfahren angewandt - allerdings auch ohne Erfolg: Die noch unreinen Stämme wurden in einem dicken Impfstrich auf der Agaroberfläche ausgestrichen. Die Pyramidon®-abbauenden Bakterien erschienen nach etwa 3 Wochen als größere Kolonien auf einem insgesamt nur sehr schwach gewachsenen Ausstrich. Mit einer sehr fein ausgezogenen, sterilen Glaskapillare wurde unter dem Stereomikroskop nur die Spitze der konvex gewölbten Kolonie vorsichtig berührt. Die an der Kapillare anhaftenden Zellen wurden auf eine frische Pyramidon®-Platte überimpft. Obwohl diese Art des Ausstrichs mit 20-30 verschiedenen Kolonien durchgeführt wurde, konnte keine einzige Reinkultur isoliert werden.

Eine Übersicht über die neu isolierten und die schon im Institut für Mikrobiologie vorhandenen Stämme (es handelt sich ausnahmslos um Reinkulturen) gibt Tabelle 1.

Laborbezeichnung der Stämme	isoliert mit	Herkunft	isoliert von
A_6	Antipyrin®	Komposterde, Botanischer Garten, Hohenheim	Blecher (197
A_{11}	"	Waldrand, Bad Wimpfen	"
A_{12}	"	Schlamm von Bachrand, Bad Wimpfen	"
A_{13}	"	Schlamm von Bachrand, Bad Wimpfen	"
A_{14}	"	Komposterde, Botanischer Garten, Hohenheim	"
M_{11}	Pyramidon®	Waldrand, Bad Wimpfen	Blecher (19
M_{13}	"	Schlamm von Bachrand, Bad Wimpfen	"
M_{15}	"	Botanischer Garten, Hohenheim	"
M_{16}	"	Botanischer Garten, Hohenheim	"
Z_5	Chloridazon	Acker, Fildergebiet	Blecher (19
Z_6	"	Botanischer Garten, Hohenheim	"
Z_7	"	Botanischer Garten, Hohenheim	"
Z_8	"	Botanischer Garten, Hohenheim	"
J_1	"	Dänemark	ENGVILD and JENSEN 196
J_2	"	Dänemark	"
E	"	Ecuador	FRÖHNER et al. 1970
R	"	Rothschwaige	"
L	"	Limburgerhof	"
N	"	Nebraska, USA	Görisch und Eberspächer (1975)

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite.

Laborbezeichnung der Stämme	isoliert mit	Herkunft	isoliert von
K_2	Chloridazon	Weide (9% Humus), Eldoret-Nakaru, Kenia	Lingens und Koch (1975)
K_3	"	Termitenhügel (7% Humus), Eldoret-Nakaru, Kenia	"
K_5	"	Moor-Sumpf-Gelände (37% Humus), Naivasha, Kenia	LINGENS et al. 1977

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und deren Herkunft. (Autorennamen in Großbuchstaben weisen auf bereits erschienene Veröffentlichungen hin.)

3.2. Morphologische Charakterisierung

Die Bakterien wachsen langsam. Auf Antipyrin®- oder Chloridazon-Mineralsalzagar sind Einzelkolonien erst nach einer Inkubationszeit von 1 Woche bei 30°C makroskopisch sichtbar. Nach dreiwöchiger Inkubation haben die Kolonien einen Durchmesser von 1-2 mm. Sie sind rund, ganzrandig, schwach konvex und farblos (Abb.2 und 3). Bei noch längeren Inkubationszeiten (ca. 6 Wochen) kann sich das Zentrum der Kolonien dunkel verfärben (Abb.4). Manche Stämme bilden glänzende , schleimige Kolonien, während andere Stämme eher trocken und matt aussehen. Die Kolonien lassen sich leicht vom Agar abnehmen.

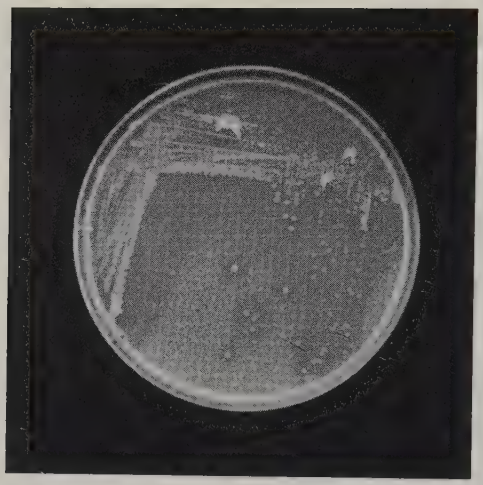


Abb.2. Stamm Z_7 auf Chloridazon-Mineralsalzagar. Das im Agar auskristallisierte Chloridazon ist im Bereich des Ausstrichs abgebaut. Anstelle dessen haben sich weisse, sternförmige Kristalle aus Chloridazon-Heterozyklus gebildet.

2 cm

Abb.3. Ausschnittsvergrößerung aus Abb.2. Durch das Verschwinden der Chloridazonkristalle sind um die Einzelkolonien klare Höfe entstanden.

1 cm

Abb.4. 6 Wochen alte Kolonien des Stammes Z_7 auf Chloridazon-Mineralsalzagar. Das Zentrum der Kolonien hat sich im Laufe der langen Inkubationszeit dunkel verfärbt.

Das typische mikroskopische Bild zeigt kokkoide Zellen bis Kurzstäbchen. Diese sind unbeweglich und bilden weder Sporen, Kapseln, Stiele noch Scheiden aus.

Aufgrund einiger Merkmalsunterschiede lassen sich die Stämme in 2 Gruppen einteilen:

1. Gruppe.

In flüssigem Antipyrin®-Mineralsalzmedium bilden die Stämme A_{11}, A_{13}, A_{14}, M_{13}, M_{15} und M_{16} ausschließlich kokkoide Formen (0,6 x 0,9 µm), die in größeren und kleineren Klumpen vorliegen (Abb.5). Einzelne Zellen treten meist nur in geringer Zahl auf. Die Verklumpung ist auch makroskopisch sichtbar: in Flüssigkulturen ist das Wachstum flockig; läßt man die Flüssigkultur einen Tag lang ruhig stehen, setzen sich alle Zellen auf dem Boden des Gefäßes ab und die überstehende Flüssigkeit erscheint völlig klar.

2. Gruppe.

Wenn man die übrigen Stämme (A_6, A_{12}, M_{11} und alle anderen unter 3.1. genannten Vergleichsstämme) in flüssigem Antipyrin®-Mineralsalzmedium anzüchtet, so sieht man unter dem Mikroskop vorwiegend Kurzstäbchen, die etwas größer (0,9 x 1,2-1,5 µm) sind als die der oben beschriebenen Stämme der Gruppe 1. Diese Kurzstäbchen treten meist einzeln (Abb.6), manchmal in Paaren oder selten in kurzen Ketten auf (Abb.7 und 8). Im Gegensatz zu den oben genannten Stämmen kommt es nie zur Klumpenbildung. Deshalb bleibt auch das Kulturmedium mach eintägigem, ruhigem Stehen vollkommen homogen getrübt.

Bei den Stämmen der 2. Gruppe treten vereinzelt - in manchen Kulturen aber auch überwiegend - pleomorphe Formen auf (Abb.9 bis 12). So findet man Stäbchen (1,0-1,5 x 2,0-5 ,0 µm), keulenförmige und elliptische Zellen 0-5 µm im Durchmesser)(Abb.13 und 14). Die Zellen können auch zu geraden oder geknickten Filamenten von sehr un-

terschiedlicher Länge (5-50 µm) auswachsen (Abb.15 und 16). Diese Filamente können sich wiederum in kokkoide Zellen, Kurzstäbchen und Stäbchen abteilen, so daß eine Kette aus gleichen oder ungleich großen Gliedern resultieren kann (Abb.17 und 18). Die Segmente eines zerfallenden Filaments bleiben zum Teil durch feine Fäden (2-5 µm lang) verbunden (Abb.19 bis 23). Bei den Stämmen K_5 und L wurden sehr (!) selten Verzweigungen beobachtet (Abb.24 und 25), denen aber wohl keine taxonomische Bedeutung zuzumessen ist. In den meisten Kulturen treten unregelmäßig geformte Partikel auf, die einen Durchmesser von 20-50 µm haben (Abb.26 und 27). Worum es sich dabei handelt, konnte bis jetzt nicht festgestellt werden.

Die Bildung von pleomorphen Formen wird dann besonders provoziert, wenn man die Stämme auf Medium D züchtet. Auf diesem Medium wachsen alle Stämme sehr schlecht. Die 1. Gruppe von Stämmen bildet hauptsächlich Kurzstäbchen (etwa 2 µm lang), nur vereinzelt längere Stäbchen und sehr selten Filamente. Die Stämme der 2. Gruppe, bei denen auch auf Antipyrin®-Mineralsalzmedium manchmal pleomorphe Formen zu beobachten sind, zeigen auf Medium D ein ausgesprochen pleomorphes Bild. Unregelmäßig geformte Zellen (Stäbchen, plumpe oder keulenförmige Stäbchen, Filamente) dominieren, nur noch vereinzelt treten Kurzstäbchen oder kokkoide Zellen auf.

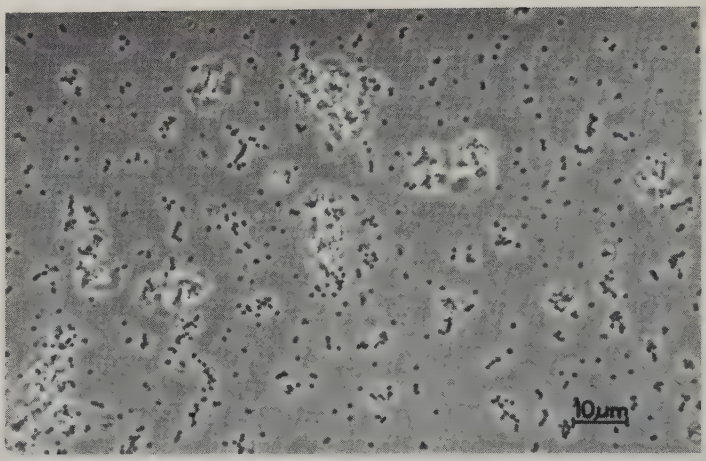


Abb.5. Stamm A_{13}, gezüchtet in Antipyrin®-Mineralsalzmedium. Typisches Beispiel für einen Stamm, der kleine, leicht verklumpende, kokkoide Zellen bildet (Gruppe 1).

Abb.6. Stamm N, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Typisches Beispiel für einen Stamm der Gruppe 2. Die Zellen sind etwas größer als die der Gruppe 1. Sie kommen einzeln oder in Paaren vor (selten auch Ketten, siehe Abb.7 und 8), Verklumpungen treten nie auf.

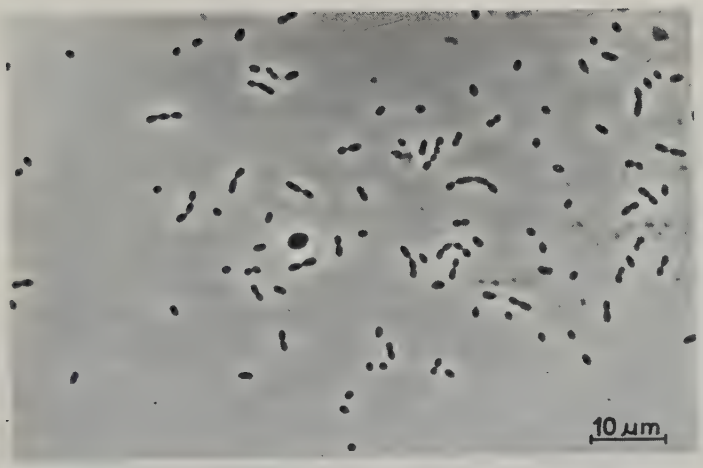


Abb.7

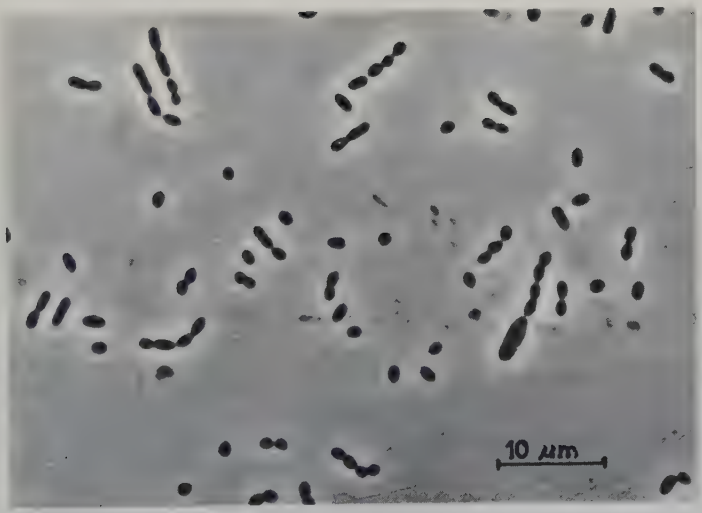


Abb.8

Abb.7 und 8. Stamm A_{12}, gezüchtet auf Antipyrin®-Mineralsalzmedium. Dieser Stamm bildet besonders viele Zellketten. Vereinzelt treten auch pleomorphe Formen auf: in Abb.7 sieht man eine große, eiförmige Zelle, in Abb.8 ein großes, plumpes Stäbchen.

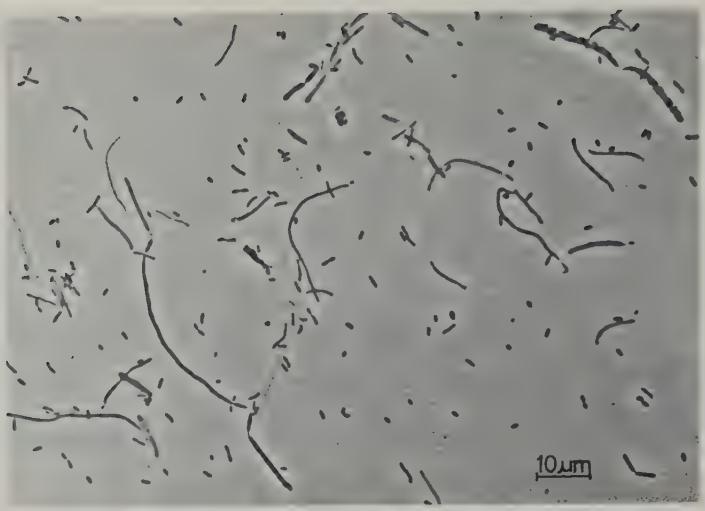


Abb.9. Stamm Z_8, gezüchtet auf Medium D. Pleomorphe Kultur: Kokkoide Zellen, Kurzstäbchen, Stäbchen verschiedener Länge, Filamente.

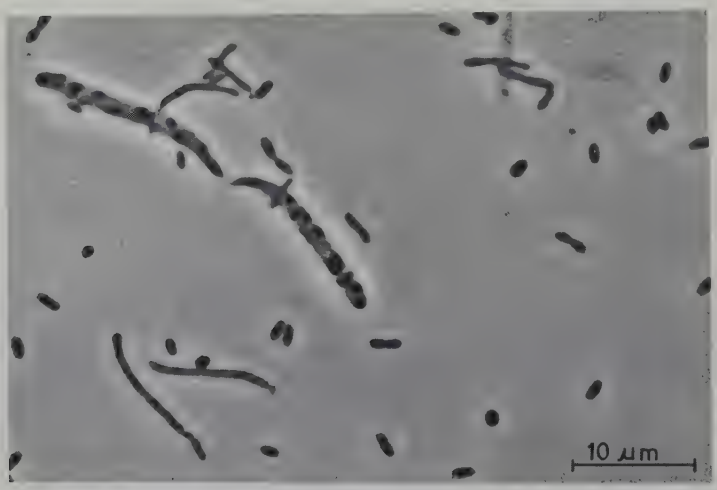


Abb.10. Ausschnittsvergrößerung aus Abb.9. In den beiden dicken Stäbchen sind Granula zu erkennen.

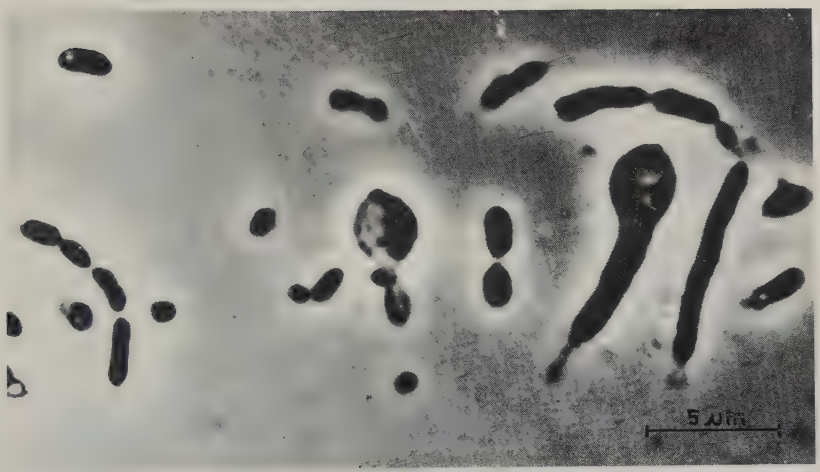


Abb.11

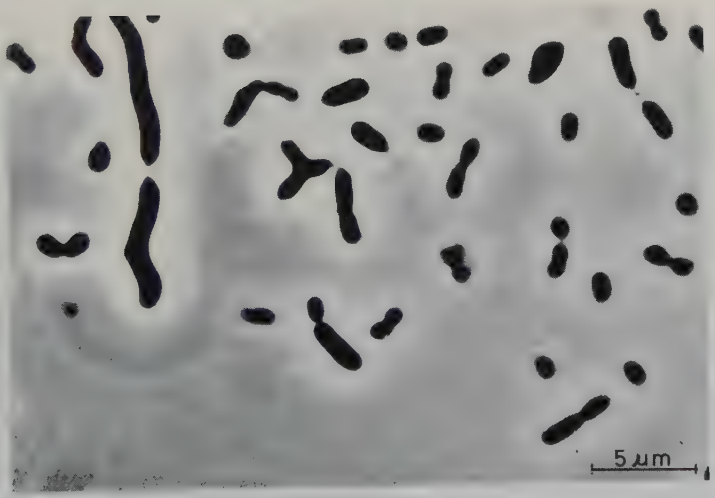


Abb.12

Abb.11 und 12. Stamm K_5, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. An diesen Bildern wird besonders deutlich, welch verschiedene Formen die Chloridazon-abbauenden Bakterien annehmen können.

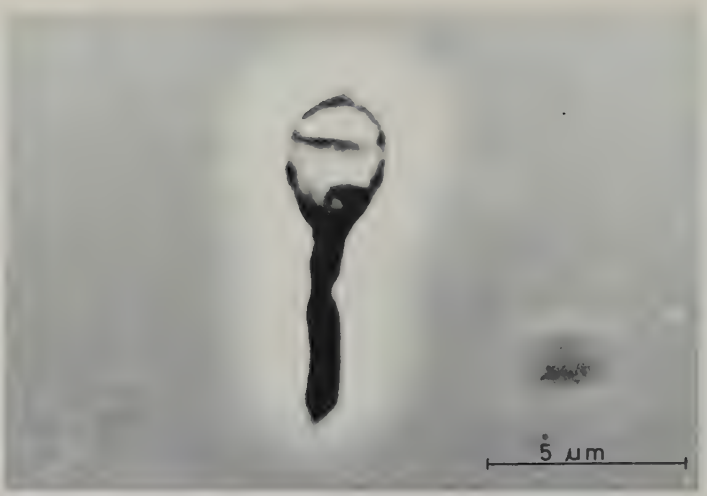


Abb.13. Stamm R, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Keulenförmige Zelle.

Abb.14. Stamm J_2, gezüchtet auf Medium D. Elliptische Zellen mit Granula; Stäbchen, kokkoide Zellen.

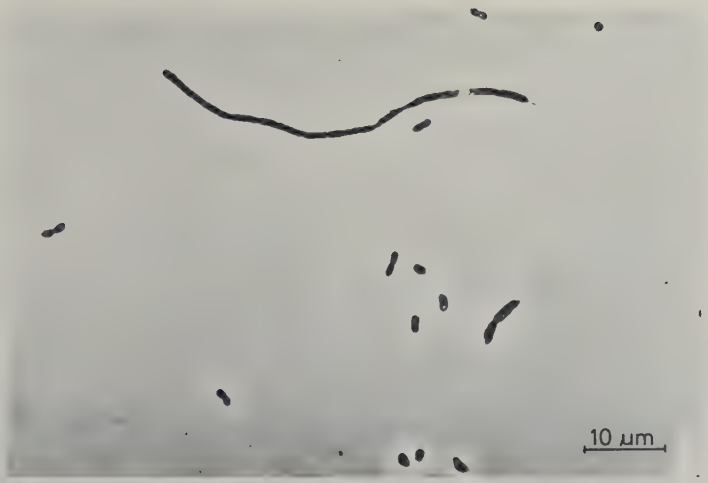


Abb.15. Stamm K_5, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Filament.

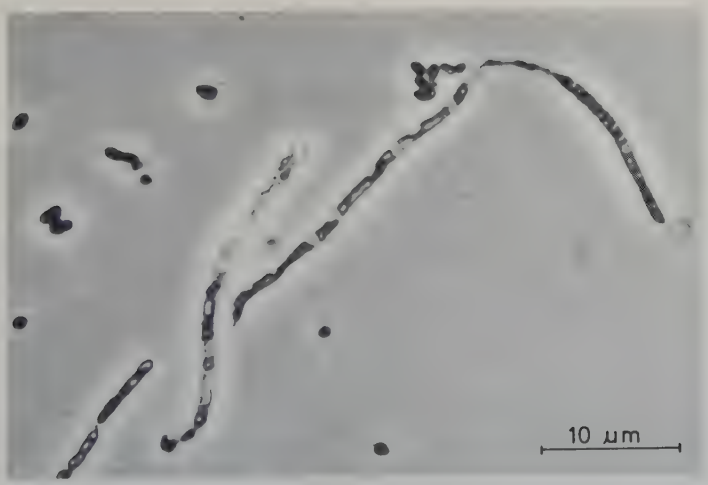


Abb.16. Stamm K_5, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Beim rechten Filament sieht man deutlich, daß der Zellinhalt nicht mehr gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt ist.

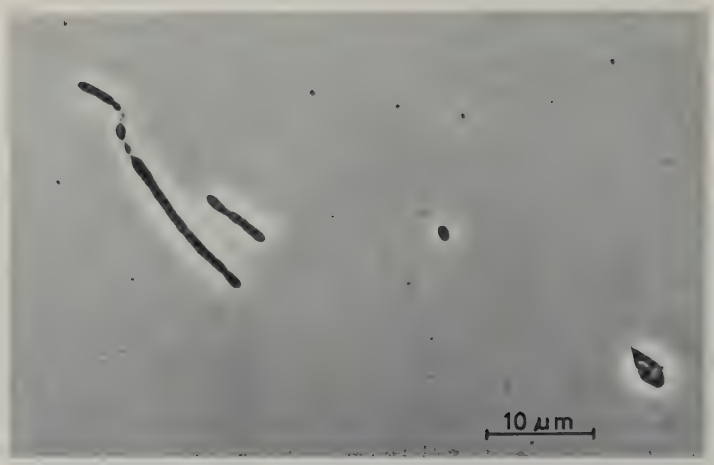


Abb.17. Stamm R, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Ein Filament hat sich in 3 unterschiedlich große Segmente abgeteilt.

Abb.18. Stamm R, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Die Kette aus verschieden langen Stäbchen ist möglicherweise aus einem Filament entstanden.

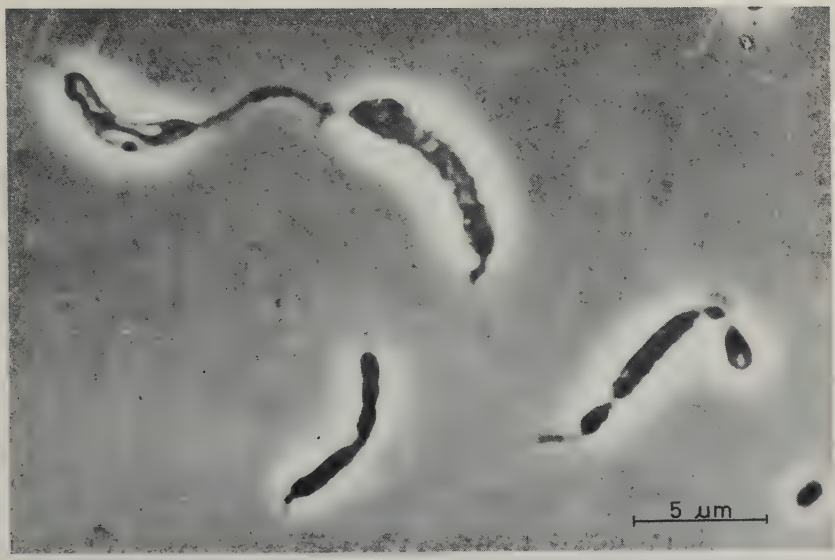


Abb.19

Abb.20

Abb.19 und 20. Stamm K_5, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Manche Stäbchen sind durch lange "Fäden" verbunden.

Abb.21. Stamm L, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Pleomorphe Kultur. Auf der linken Bildhälfte zwei durch einen "Faden" verbundene Filamente.

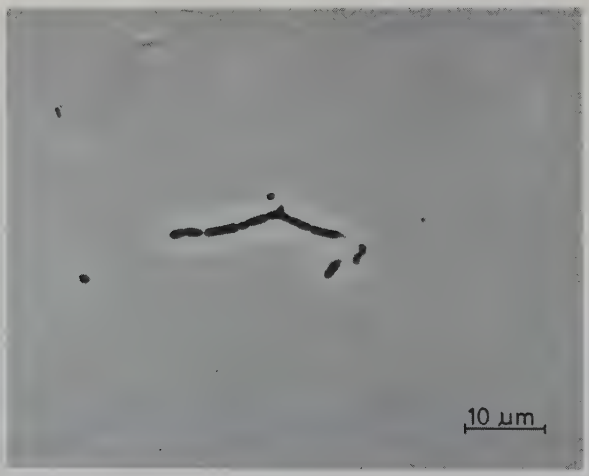


Abb.22. Stamm K_5, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Filament mit angedeuteter Verzweigung. Verschiedene Partikel sind über "Fäden" mit dem Filament verbunden.

Abb.23. Elektronenmikroskopische Aufnahme.
Stamm K_5, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Man sieht hier besonders deutlich den "Faden", der die beiden Zellen verbindet.

Abb.24

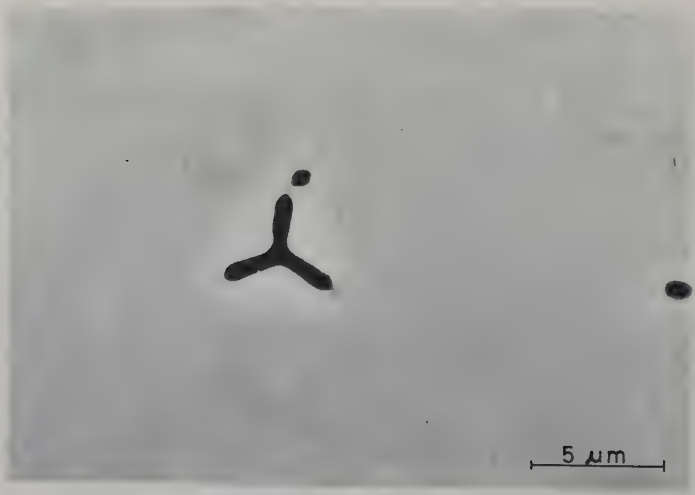


Abb.25

Abb.24 und 25. Stamm K_5, gezüchtet in Chloridazon-Mineralsalzmedium. Verzweigte Zellen, wie sie auf den beiden obenstehenden Aufnahmen zu sehen sind, treten nur sehr selten auf.

Abb.26. Stamm J_2, gezüchtet auf Medium D. Regelmäßig auftretender Partikel mit charakteristischen Tröpfchen auf der Oberfläche. Die Bedeutung ist unbekannt.

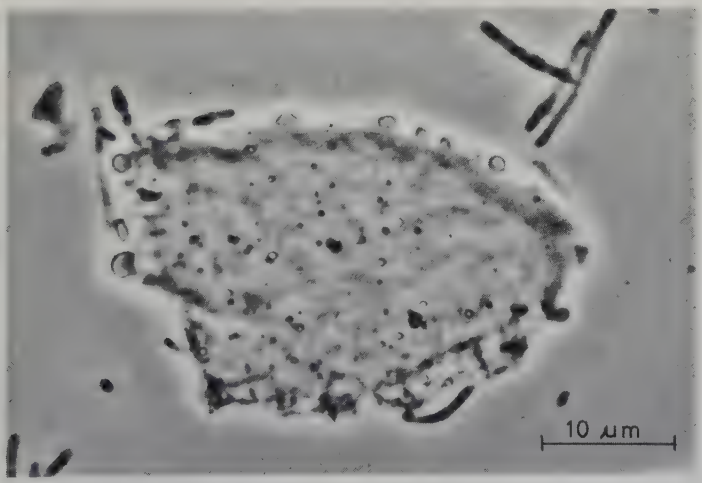


Abb.27. Ausschnittsvergrößerung aus Abb.26.

3.3. Physiologische Charakterisierung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Bakterien sind osmotisch empfindlich und haben spezielle Wachstumsansprüche (siehe auch 3.5.). Deshalb war es nicht möglich, die zur physiologischen Charakterisierung üblicherweise verwendeten Medien einzusetzen. Es wurde deshalb für jeden Versuch ein spezieller Nährboden entwickelt (siehe 2.7.1.).

Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden alle Versuche mit sämtlichen unter 3.1. genannten Stämmen durchgeführt. Außerdem wurde als Kontrolle bei jedem Versuch ein bekannter Bakterienstamm mit positiver und ein Stamm mit negativer Reaktion mitgeführt. Die Inkubationstemperatur betrug grundsätzlich 30°C.

Die Stämme zeigten in ihrer Physiologie sehr weitgehende Übereinstimmung. Sie sind durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

Gram-Färbung und Ziehl-Neelsen-Färbung sind negativ.

Die Stämme wachsen ausschließlich aerob.

Der Metabolismus ist oxidativ und chemoorganotroph.

Fermentationsversuche wurden lediglich mit 10 Stämmen durchgeführt. Da sich diese Stämme völlig identisch verhielten, wurde auf die Untersuchung der restlichen Stämme verzichtet. Aus keiner der folgenden Verbindungen wurde Säure oder Gas gebildet:

N-Acetyl-glucosamin	Dulcit
Adonit	Erythrit
Amygdalin	D(-)Fructose
Amylose	Galaktose
D(-)Arabinose	D(+)Glucose
L(+)Arabinose	Glycerin
Dextrin	Glykogen

m-Inosit	D(+)Raffinose
Inulin	Rhamnose
Lactose	Ribose
Maltose	Saccharose
Mannit	Salicin
D(+)Mannose	Sorbit
D(+)Melezitose	L(-)Sorbose
D(+)Melibiose	Stärke
Methyl-D-glucopyranosid	D(-)Trehalose
Methyl-D-mannopyranosid	D(+)Xylose
Methyl-D-xylopyranosid	L(-)Xylose

Nitrat wird nicht zu Nitrit reduziert.

NH_4^+ und NO_3^- werden beide als Stickstoffquellen verwertet.

Mit N_2 als einziger Stickstoffquelle erfolgt kein Wachstum.

(Als Nebenbefund wurde bei den Versuchen zur Stickstoffverwertung festgestellt, daß die Stämme in einem annähernd stickstoff-freien Mineralsalzmedium die Substrate Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon lediglich bis zu den entsprechenden Brenzkatechinderivaten abbauen. Die Medien färben sich dadurch dunkel.)

Katalase ist in allen Stämmen enthalten.

Die Oxidase-Reaktion ist schwach positiv bei jungen Kulturen, sehr schwach positiv bei 3 Wochen alten Kulturen.

Urease ist nicht enthalten.

Gelatine, Casein, Stärke und Agar werden nicht hydrolysiert.

Aus Thiosulfat oder L-Cystein wird sehr wenig H_2S gebildet

Methylrot- und Voges-Proskauer-Test sind negativ.

Aus Tryptophan wird kein Indol gebildet.

Das Temperaturoptimum für das Wachstum beträgt 28-30°C. Bei 37°C findet kein Wachstum mehr statt. (Die Kulturen sterben ab, wenn man sie 5 Tage lang bei 37°C aufbewahrt.)

Die meisten Stämme benötigen Vitamin B_{12} als organischen Wachstumsfaktor. Lediglich die Stämme A_{11} und A_{13} ließen sich über mehrere Wochen ohne Vitamin B_{12}-Zusatz züchten.

Besonders in solchen Medien, die als einzige Kohlenstoffquelle L-Phenylalanin oder Phenylpyruvat enthalten, kann eine gelblich-grüne Färbung der Kulturflüssigkeit auftreten. Dieser Farbstoff fluoresziert nicht.

Während des Wachstums verändern sich die pH-Werte der Medien. Nach Erreichen der stationären Phase beträgt der pH-Wert in Antipyrin® bzw. Chloridazon-Medien 5,4 , in Komplettmedium B 8,2 .

3.4. Antibiotika-Empfindlichkeit

Da Übereinstimmungen im Resistenzmuster einen weiteren guten Hinweis auf eine nahe Verwandtschaft der Stämme geben können, wurde die Antibiotika-Empfindlichkeit der einzelnen Stämme besonders eingehend untersucht. Alle 22 Stämme wurden auf ihre Reaktion gegenüber 17 verschiedenen Antibiotika getestet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Aus dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, daß nur bei 3 der untersuchten Antibiotika unterschiedliche Reaktionen auftraten.

Antibiotikum		Anzahl der resistenten Stämme	Anzahl der sensitiven Stämme	Durchschnittlicher Hemmhofdurchmesser (in mm)
Ampicillin	10 µg	-	22	25
Bacitracin	10 µg	-	22	41
Cephaloridin	5 µg	22	-	-
Chloramphenicol	10 µg	-	22	30
Cloxacillin	5 µg	22	-	-
Colistinsulfat	10 µg	16	6	10
Erythromycin	10 µg	22	-	-
Fusidinsäure	10 µg	22	-	-
Kanamycin	5 µg	-	22	21
Lincomycin	2 µg	22	-	-
Methicillin	10 µg	22	-	-
Neomycin	10 µg	-	22	16
Novobiocin	5 µg	7	15	29
Penicillin G	10 U	4	18	28
Streptomycin	10 µg	-	22	16
Sulfafurazol	100 µg	22	-	-
Tetracyclin	10 µg	-	22	50

Tabelle 2. Verhalten der Bakterienstämme gegenüber Antibiotika.

3.5. Wachstumsansprüche und osmotische Empfindlichkeit

Ein besonderes Merkmal der Chloridazon-abbauenden Bakterien, das schon in den ersten Veröffentlichungen (FRÖHNER et al., 1970; ENGVILD and JENSEN, 1969) beschrieben wurde, sind die besonderen Wachstumsansprüche dieser Bakterien.

Nur auf wenigen aromatische Verbindungen, wie z.B. Antipyrin® und Chloridazon, lassen sich diese Bakterien mit guter Zellausbeute züchten.

Einfache, definierte Verbindungen wie Zucker, Alkohole, Aminosäuren (außer L-Phe), Mono- und Dicarbonsäuren werden entweder gar nicht oder nur in ganz geringem Umfang als Kohlenstoffquelle genutzt.

Auch auf normal konzentrierten Komplettmedien lassen sich diese Stämme nicht züchten. Das unter 2.3. angegebene Komplettmedium A wirkt geradezu hemmend auf diese Bakterien. Die Hemmwirkung kann man sehr einfach mit folgendem Versuch demonstrieren: Es werden Agarplatten aus Komplettmedium A unter Zusatz von 1 g Antipyrin®/l hergestellt. Als Vergleich dienen Agarplatten, die als Basis Mineralsalzmedium enthalten, dem ebenfalls 1 g Antipyrin®/l zugesetzt ist. Die Stämme werden gleichzeitig auf beide Medien angeimpft. Nach einer Inkubationszeit von einer Woche bei 30°C sind die Stämme auf den Minimalplatten sehr gut und auf den Komplettplatten kaum oder gar nicht gewachsen.

Wie unter 2.6. schon erwähnt, läßt sich die Hemmwirkung von Komplettmedium A zu einer einfachen Überprüfung auf Kontaminationen ausnützen. Wenn auf diesem Komplettagar Kolonien sichtbar werden, so ist die Kultur mit Sicherheit durch fremde Mikroorganismen verunreinigt.

Auf sehr stark verdünntem Komplettmedium (Komplettmedium B) wachsen die Stämme nur sehr langsam und schwach (Abb.28). Das Komplettmedium B, das von FRÖHNER et al.

(1970) entwickelt wurde, ist deshalb zur fortlaufenden Kultivierung der Stämme und zur Gewinnung von größeren Zellmengen nicht geeignet.

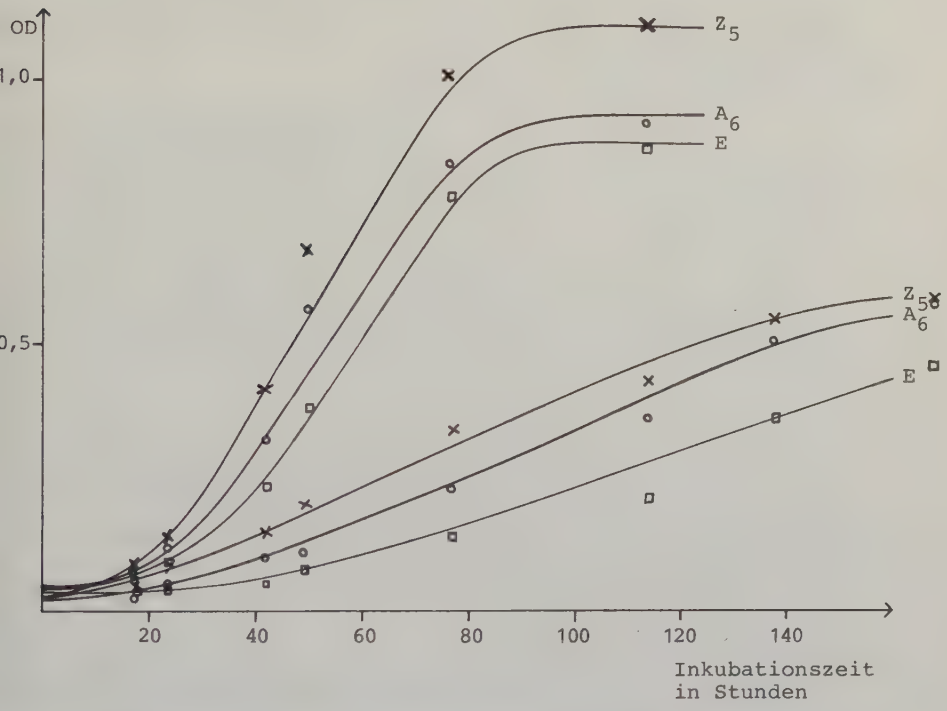


Abb.28. Wachstumsverhalten verschiedener Stämme in Antipyrin®-Mineralsalzmedium und in verdünntem Komplettmedium.- Der Versuch wurde mit 22 Stämmen durchgeführt. Alle 22 Stämme zeigten sehr ähnliches Wachstumsverhalten. Als exemplarische Beispiele dienen die Stämme Z_5, A_6 und E.
Obere 3 Kurven: 3 Stämme (Z_5,A_6,E) in Mineralsalzmedium, das als einzige Kohlenstoffquelle 1 g Antipyrin®/l enthält. Untere 3 Kurven: dieselben Stämme in verdünntem Komplettmedium (Komplettmedium B, siehe 2.3.).
Alle 22 Stämme sind in Minimalmedium nach etwa 80 Stunden voll ausgewachsen. In verdünntem Komplettmedium ist die Wachstumsgeschwindigkeit sehr viel geringer: nach einer Woche haben die Kulturen im Durchschnitt erst eine optische Dichte (OD) von 0,4-0,5 erreicht.

Der Stamm N, der insgesamt eine gewisse Sonderstellung unter den 22 Stämmen einnimmt, fiel auch bei den Wachstumsversuchen in verdünntem Komplettmedium durch sein besonderes Verhalten auf. In Komplettmedium B wächst Stamm N deutlich besser als alle übrigen Stämme, die optische Dichte beträgt nach einer Woche 0,7-0,8.

Die Hemmwirkung von normal konzentrierten Komplettmedien läßt auf eine osmotische Empfindlichkeit der Stämme schließen, die auch von FRÖHNER et al. (1970) schon beobachtet wurde.

Um diese osmotische Empfindlichkeit etwas genauer einzugrenzen, wurden die Stämme auf Mineralsalzmedium (Submerskulturen) angeimpft, die 0,5 g Antipyrin®/l und steigende Mengen an NaCl enthielten. Die Versuche wurden mit 7 verschiedenen Stämmen durchgeführt (E, K_5, Z_6, J_2, R, L und A_{11}). Als Vergleichsstämme dienten Escherichia coli und Pseudomonas putida. Für diese beiden Stämme wurde als Kohlenstoffquelle anstelle von Antipyrin® 0,5 g Glucose /l verwendet.

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche sind in Abb.29 dargestellt. Aus der Zeichnung ist zu erkennen, daß die Vergleichsstämme auch durch einen Zusatz von 14 g NaCl /l Medium in ihrem Wachstum nicht beeinträchtigt werden. Escherichia coli wächst bei diesen hohen Salzkonzentrationen sogar etwas besser als auf dem ursprünglichen Minimalmedium, das nur eine geringe Ionenstärke hat. Die Chloridazon-abbauenden Bakterien dagegen werden bereits deutlich im Wachstum gehemmt, wenn man dem Medium 7 g NaCl /l zusetzt. Bei einem NaCl-Zusatz von ca. 10 g /l stellen die Stämme das Wachstum völlig ein.

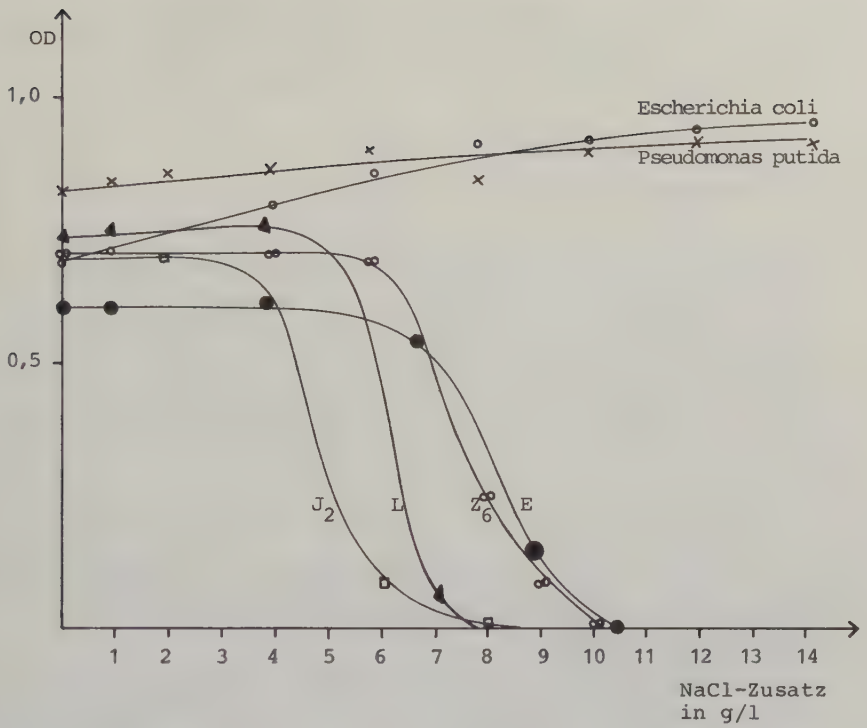


Abb.29. Osmotische Empfindlichkeit der Stämme.
Die Stämme wurden jeweils in 14 verschiedenen Kolben angezüchtet, die Mineralsalzmedium, 0,5 g Substrat /l und steigende Mengen an NaCl enthielten. Escherichia coli und Pseudomonas putida wurden 1 Tag lang, die Chloridazon-abbauenden Bakterien 1 Woche lang inkubiert. Daraufhin wurde bei jedem Kolben die optische Dichte gemessen.
Ergebnis: Während die Vergleichsstämme (Escherichia coli und Pseudomonas putida) auch durch höhere Salzkonzentrationen nicht im Wachstum gehemmt werden, lassen sich die Chloridazon-abbauenden Bakterien nur bei geringer Ionenstärke züchten.

Zur weiteren Charakterisierung der Stämme wurde im Folgenden das Wachstumsverhalten auf verschiedenen Substraten näher untersucht.

3.6. Abbau von Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon

3.6.1. Wachstumsversuche, Wachstumskurven, DC

Die neu isolierten Stämme wurden auf Antipyrin®-, Pyramidon®- und Chloridazon-Mineralsalzmedien (Submerskulturen) angeimpft und das Wachstum durch Trübungsmessung am Photometer verfolgt. Die Vorzucht erfolgte jeweils auf dem Substrat, mit dem der Bakterienstamm isoliert worden war. Der Vollständigkeit halber wurden bei diesen Versuchen auch alle übrigen unter 3.1. genannten Stämme mitgeführt.

Die Ergebnisse dieser Wachstumsversuche sind in Tabelle 3 dargestellt.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß nur 2 der über Antipyrin® und Pyramidon® selektionierten Stämme auch mit Chloridazon wachsen.

Umgekehrt fällt auf, daß von 13 über Chloridazon isolierten Stämmen nur 1 Stamm nicht mit Antipyrin® wächst.

Mit Hilfe der Wachstumskurven (Abb.30), die bei allen 22 Stämmen jeweils für Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon aufgenommen wurden, läßt sich die Wachstumswirksamkeit dieser 3 Substrate gut miteinander vergleichen.

Wenn ein Stamm sowohl mit Antipyrin® als auch mit Chloridazon wächst, dann baut er - unabhängig von der Art der Vorzucht - diese beiden Substrate auch mit derselben Geschwindigkeit ab. Das heißt für die Praxis, daß man Antipyrin® und Chloridazon wahlweise zum Züchten verwenden kann. Pyramidon® ist dagegen ein deutlich schlechteres Substrat. Das gilt auch für diejenigen Stämme, die ursprünglich über Pyramidon® selektioniert worden waren.

Stamm	isoliert mit	Wachstum mit Antipyrin®	Pyramidon®	Chloridazon
A_6	Antipyrin®	+	-	+
A_{11}	"	+	+	-
A_{12}	"	+	-	+
A_{13}	"	+	+	-
A_{14}	"	+	+	-
M_{11}	Pyramidon®	+	+	-
M_{13}	"	+	+	-
M_{15}	"	+	+	-
M_{16}	"	+	+	-
Z_5	Chloridazon	+	-	+
Z_6	"	+	-	+
Z_7	"	+	-	+
Z_8	"	+	-	+
J_1	"	+	-	+
J_2	"	+	+	+
E	"	+	-	+
R	"	+	+	+
L	"	+	+	+
N	"	-	-	+
K_2	"	+	-	+
K_3	"	+	-	+
K_5	"	+	-	+

Tabelle 3. Wachstumsversuche mit Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon.

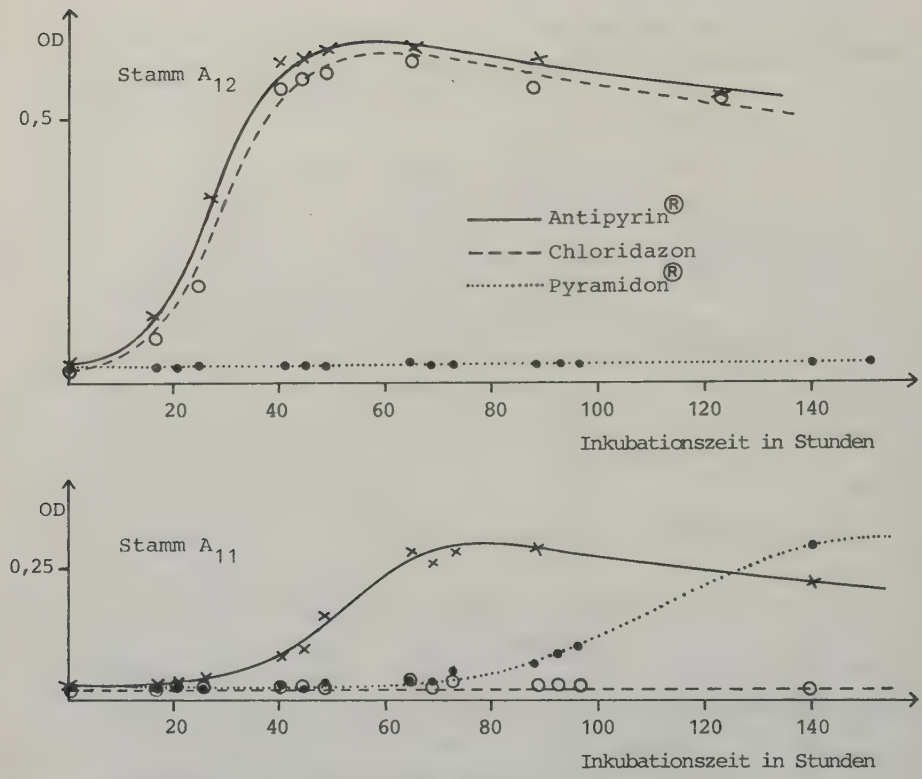


Abb.30. Wachstumsversuche mit Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon.
Beide Stämme wurden 3 Tage in Antipyrin®-Mineralsalzmedium vorgezüchtet, dann wurden jeweils 0,5 ml der Vorkultur auf 40 ml Antipyrin®-, Pyramidon®- und Chloridazon-Mineralsalzmedium überimpft.
Stamm A_{12}: gleich gutes Wachstum mit Antipyrin® und Chloridazon; kein Wachstum mit Pyramidon®.
Stamm A_{11}: beim Wachstum in Antipyrin®-Medium wird eine relativ geringe optische Dichte erreicht, da die Zellen stark zusammenklumpen (dasselbe gilt für die Stämme A_{13}, A_{14}, M_{13}, M_{15}, M_{16}, siehe auch 3.2.); Wachstum mit Pyramidon® erst nach längerer lag-Phase (bei anderen Stämmen auch zu beobachten); kein Wachstum mit Chloridazon.

Die Wachstumsversuche mit Pyramidon® sind zum Teil nicht reproduzierbar. (Beim ersten Versuch Wachstum, beim nächsten Versuch wiederum kein Wachstum.) Charakteristisch für das Wachstum auf Pyramidon® ist eine gelb-braune (bernsteinfarbene) Färbung der Kulturflüssigkeit.

Neben den photometrischen Mesungen wurde der Abbau der 3 Substrate auch durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen verfolgt. Nach Erreichen der stationären Phase waren in den Antipyrin®- und Chloridazon-Kulturen jeweils die entsprechenden entphenylierten Heterozyklen enthalten, wie sich durch Vergleich mit den authentischen Substanzen nachweisen ließ. Auch in den Pyramidon®-Kulturen war eine Verbindung neu entstanden, die bei späteren Untersuchungen (3.8.) als Heterozyklus von Pyramidon® identifiziert wurde.

3.6.2. Resting cells-Versuche mit Stamm N

Stamm N wächst - dünn angeimpft - weder auf Antipyrin® noch auf Pyramidon®. Züchtet man den Stamm jedoch in Chloridazon-Medium vor und überimpft größere Zellmengen in Antipyrin®-Medium (resting cells-Versuch), dann wird Antipyrin® langsam abgebaut. Nach mehrtägiger Inkubationszeit auf der Schüttelmaschine bei 30°C ist im Medium nur noch der Heterozyklus von Antipyrin® nachzuweisen.

3.6.3. Akkumulation des Brenzkatechinderivats von Chloridazon

Obwohl insgesamt 7 Stämme (siehe Tabelle 3) nicht auf Chloridazon zu züchten sind, so ist bei diesen Stämmen dennoch ein gewisses "Restwachstum" in Chloridazon-Medien zu beobachten. Gleichzeitig färbt sich das Medium dunkel. Da diese Braun-Schwarzfärbung auf phenolische Hydroxylgruppen schließen ließ, wurde mit Nitrit-Molybdat-Reagenz (siehe 2.8.) auf ein Brenzkatechinderivat geprüft. Der

Test verlief - besonders bei den Stämmen A_{11}, A_{13} und A_{14} - deutlich positiv.

Die phenolische Verbindung konnte dünnschichtchromatographisch als Brenzkatechinderivat des Chloridazons (5-Amino-4-chlor-2(2,3-dihydroxyphenyl)-3(2H)-pyridazinon) identifiziert werden.

Dieser Befund legte die Vermutung nahe, daß das Unvermögen einiger Stämme, auf Chloridazon zu wachsen, auf eine Veränderung der Metapyrocatechase zurückzuführen ist. Untersuchungen von MÜLLER (1977) bestätigten diesen Verdacht: Stämme, die nicht auf Chloridazon wachsen, besitzen eine Metapyrocatechase, die das Brenzkatechinderivat des Antipyrins® gut, das entsprechende Derivat des Chloridazons aber nur sehr schlecht spaltet.

Dieser enzymatische Block läßt sich zur Herstellung größerer Mengen des Brenzkatechinderivats von Chloridazon ausnützen: In einem 10 l-Fermentor (1g Antipyrin®/l) wird der Stamm A_{11} gezüchtet, dann abzentrifugiert, gewaschen und unter resting cells-Bedingungen in 1 l Chloridazon-Mineralsalzmedium (1 g Chloridazon /l) inkubiert. Unter diesen Bedingungen werden etwa 40% der eingesetzten Chloridazonmenge innerhalb von 12 Stunden in das entsprechende Brenzkatechinderivat umgewandelt.

3.7. Aufklärung des Pyramidon®-Abbauwegs

Die Abbauwege von Chloridazon (siehe Abb.1) und von Antipyrin® wurden bereits eingehend untersucht und aufgeklärt (Literaturstellen siehe Einleitung). Die entsprechenden Metaboliten von Pyramidon® wurden bis jetzt noch nicht isoliert.

Man kann davon ausgehen, daß sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen Stämme, die auf Pyramidon® wachsen (siehe Tabelle 3), dieses auch in derselben Weise abbauen. (Bei allen diesen Stämmen Akkumulation des entphenylierten

Heterozyklus von Pyramidon® in der Kulturflüssigkeit.) Deshalb wurden die Abbauversuche nur mit einem Stamm (M_{13}) durchgeführt. Dieser Stamm ist mit Pyramidon® selektioniert und wächst relativ gut in Mineralsalzmedium mit Pyramidon® als einziger Kohlenstoffquelle. Die Gewinnung von Pyramidon®-Metaboliten erfolgte grundsätzlich unter resting cells-Bedingungen.

3.7.1. Isolierung des Brenzkatechinderivats von Pyramidon®

Der Stamm M_{13} wurde 36 Stunden lang im 10 l-Fermentor auf Antipyrin® (1 g/l) vorgezüchtet, dann abzentrifugiert und die Zellen mit Mineralsalzmedium (ohne Kohlenstoffquelle) gewaschen. Die Zellen wurden darauf 20 Stunden in 1 l Pyramidon®-Mineralsalzmedium (0,5 g Pyramidon®/l) inkubiert. Dann wurde abzentrifugiert und das Medium am Rotationsverdampfer vollständig eingedampft. Der trokkene Rückstand wurde mehrmals mit Äthanol (96%) eluiert, und die gesammelten Eluate (etwa 200 ml) wurden auf 3-5 ml eingedampft. Das konzentrierte Eluat wurde auf eine Sephadex LH 20 Säule (2,5 x 100 cm) gegeben und mit Äthanol (96%) chromatographiert. Nach der Säulentrennung wurden die einzelnen Fraktionen dünnschichtchromatographisch untersucht. Außerdem wurde aus sämtlichen Fraktionen eine Probe von jeweils 0,5 ml entnommen und damit der Test auf Brenzkatechinderivate (siehe 2.8.) durchgeführt.

Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, daß die Kulturflüssigkeit beim Abbruch des resting cells-Versuchs noch geringe Mengen an Pyramidon® enthalten hatte und daß eine andere Verbindung neu entstanden war, die im Brenzkatechin-Test positiv reagierte. Weiterhin waren etwa 8-10 andere Produkte auf dem Schreiberdiagramm als peaks sichtbar; diese wurden aber nicht näher untersucht und identifiziert. Erfahrungsgemäß erfaßt man bei dieser

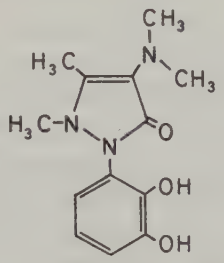
Art der Aufarbeitung oft auch Nebenprodukte des Abbaus. Außerdem können Verbindungen aus dem Primär- und Sekundärstoffwechsel der Bakterien enthalten sein, die überhaupt nichts mit dem Pyramidon®-Abbau zu tun haben.

Da die Fraktion, die im Brenzkatechin-Test positiv reagierte, nicht sauber von den übrigen Substanzen getrennt war, und auch eine erneute Säulentrennung über Sephadex LH 20 keine deutliche Verbesserung ergab, wurde ein anderes Trennsystem aufgebaut. Dafür bot sich die Übertragung der Dünnschichtchromatographie auf Säulenchromatographie an. Im Laufmittelsystem Chloroform - Äthanol - Aceton (74:1:25; v/v) war auf Kieselgel-Platten eine gute Trennung erzielt worden. Als Säulenfüllmaterial wurde deshalb Merck-Kieselgel 60, Korngröße 0,040-0,063 mm, gewählt. Eine Säule (2,5 x 60 cm) wurde trocken mit diesem Material gefüllt und dann mit Chloroform äquilibriert. Die Säule wurde - nach Aufgabe der in Chloroform gelösten Verbindung - mit einem Gradienten eluiert (Chloroform gegen Chloroform - Äthanol (80:20; v/v)). Auf diese Weise konnte eine vollständige Trennung des Brenzkatechinderivats von den übrigen Substanzen erreicht werden. Beim Eindampfen der Fraktion auf etwa 1 ml fiel die Verbindung in reinweißen Kristallen aus. Diese wurden sofort abfiltriert und bei -18°C unter Stickstoff aufbewahrt.

Es handelt sich um ein weißes, mikrokristallines Pulver, das sich gut in Äthanol (96%) löst. In wässriger Lösung ist die Verbindung nicht stabil (Braunfärbung). Bei der Schmelzpunktsbestimmung in einer Kapillare färbt sich die Substanz bei 187°C braun und geht bei 191,5-192°C in eine klare Schmelze über. Beim weiteren Erhitzen nimmt die Intensität der Braunfärbung stark zu. Im Brenzkatechin-Test (siehe 2.8.) reagiert die Verbindung positiv. Bei der Chromatographie auf Dünnschichtplatten

(siehe 2.9.) läuft die Verbindung unter "Schwanzbildung". Der Rf-Wert schwankt je nach aufgetragener Substanzmenge zwischen 0,35-0,39. Nach mehrstündigem Liegen der Kieselgelplatte färbt sich der Substanzfleck und der "Schwanz" hellbraun. Besprüht man die Platte sofort nach der Chromatographie mit Ehrlichs Reagenz, so entsteht nach einigen Stunden eine blaßgelbe Färbung.

Aufgrund dieser Eigenschaften und der spektroskopischen Daten (Abb. 31-33) wird folgende Struktur vorgeschlagen:



Brenzkatechinderivat von Pyramidon®
4-Dimethylamino-2,3-dimethyl-1-(2,3-dihydroxyphenyl)-pyrazolon-(5)

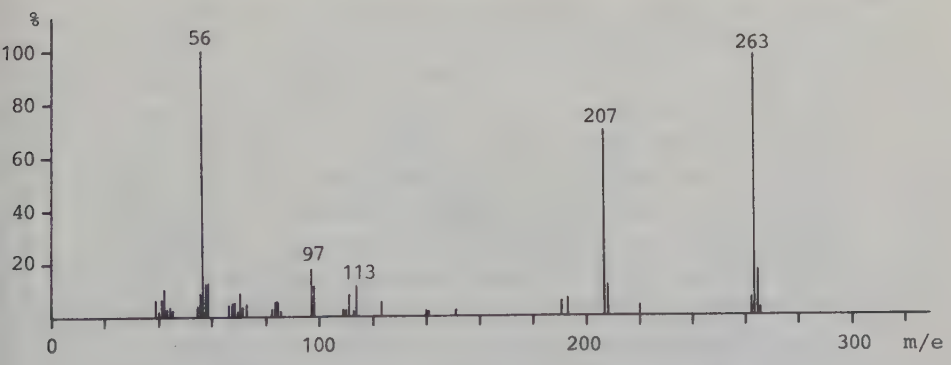


Abb.31. Massenspektrum des Brenzkatechinderivats von Pyramidon®

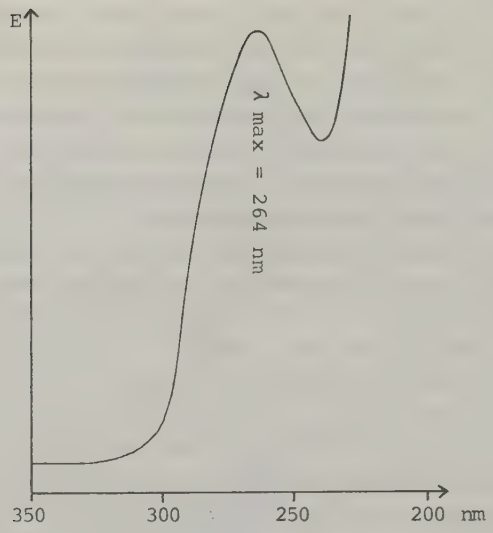


Abb.32. UV-Spektrum des Brenzkatechinderivats von Pyramidon®.

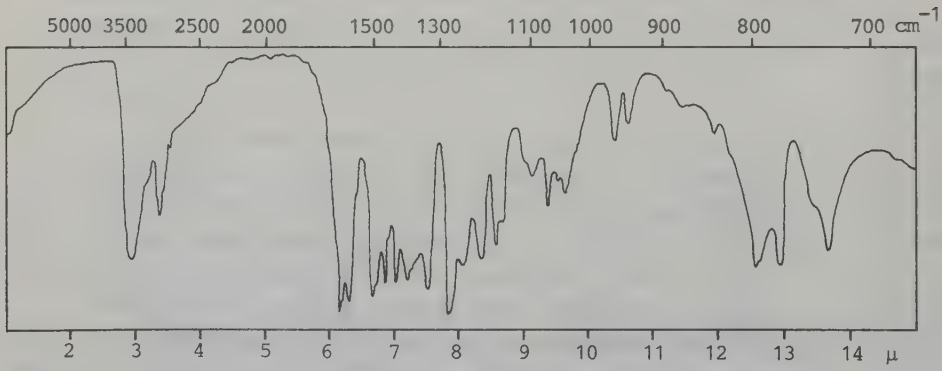


Abb.33. IR-Spektrum des Brenzkatechinderivats von Pyramidon®.

3.7.2. Isolierung des entphenylierten Heterozyklus von Pyramidon®

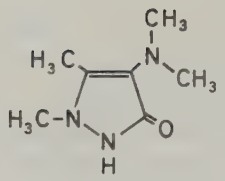
Die Züchtung des Stammes M_{13} wurde durchgeführt wie unter 3.7.1. beschrieben. Im resting cells - Versuch wurden die Zellen jedoch etwas länger (22 Stunden) und auf einer Schüttelmaschine mit höherer Schüttelfrequenz inkubiert. (Durch die erhöhte Sauerstoffzufuhr wird die Metabolisierung stark beschleunigt).

Die Aufarbeitung der Kulturflüssigkeit erfolgte wie oben beschrieben. Die Fraktionen des ersten Säulenlaufs über Sephadex LH 20 wurden dünnschichtchromatographisch und mit Hilfe des Brenzkatechin-Tests analysiert. Es konnte weder Pyramidon® noch sein Brenzkatechinderivat nachgewiesen werden. Dafür war eine andere, unbekannte Verbindung neu entstanden. Diese wurde mit Hilfe der oben beschriebenen Kieselgel-Säule weiter gereinigt. Um die Elution zu beschleunigen, wurde die Zusammensetzung des Gradienten leicht variiert: Chloroform gegen Chloroform - Äthanol (60:40; v/v). Beim Eindampfen der entsprechenden Fraktion fielen gelbliche Kristalle aus, die zur weiteren Reinigung einmal aus Äthanol (96%) umkristallisiert wurden.

Die Verbindung wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie, UV- und IR-Spektroskopie (Abb.34-36) identifiziert.

Es handelt sich um ein weißes, mikrokristallines Pulver, das bei 188-189°C schmilzt und sich gut in Äthanol (96%) löst. Bei der Dünnschichtchromatographie läuft die Substanz mit "Schwanz". Der Rf-Wert schwankt je nach aufgetragener Substanzmenge zwischen 0,1-0,2. Nach Besprühen mit Ehrlichs Reagenz färben sich der Substanzfleck und der "Schwanz" nach einigen Stunden blaßgelb an.

Aufgrund der ermittelten Daten wird folgende Struktur vorgeschlagen:



Entphenylierter Heterozyklus von Pyramidon®
4-Dimethylamino-2,3-dimethyl-pyrazolon-(5)

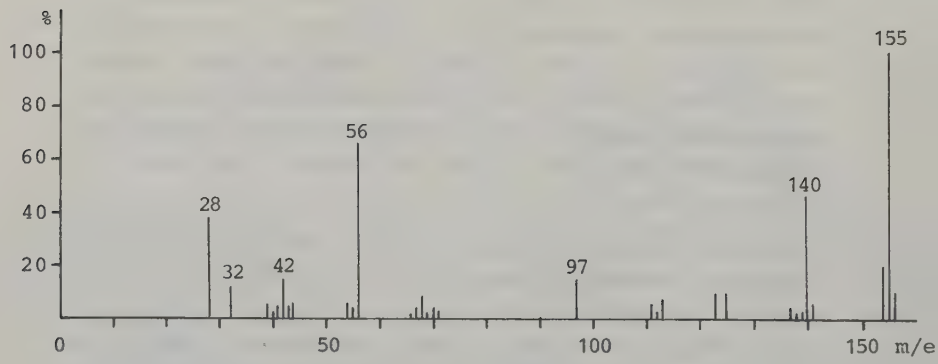


Abb.34. Massenspektrum des entphenylierten Heterozyklus von Pyramidon®

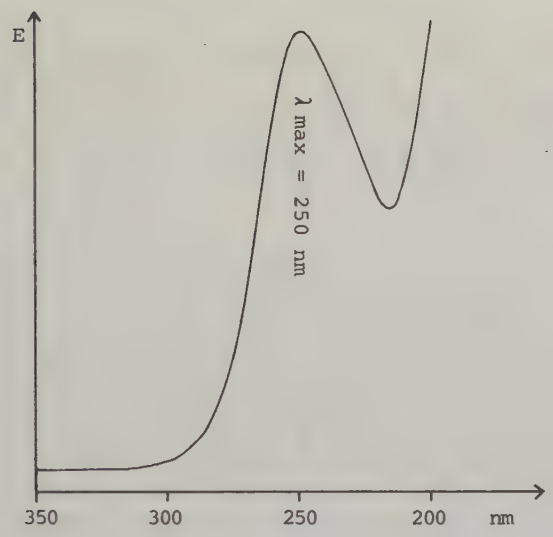


Abb.35. UV-Spektrum des entphenylierten Heterozyklus von Pyramidon®

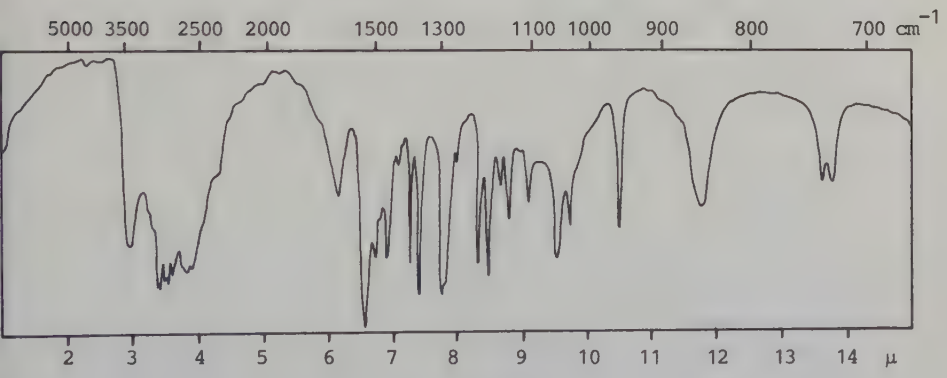


Abb.36. IR-Spektrum des entphenylierten Heterozyklus von Pyramidon®

3.8. Abbau von Aminoantipyrin

Wachstumsversuche mit Aminoantipyrin ergaben, daß diese Verbindung zum Züchten der Stämme wenig geeignet ist. Etwa 80% der Stämme (22 Stämme wurden untersucht) wachsen langsam und mit geringer Zellausbeute auf Aminoantipyrin, die restlichen Stämme wachsen überhaupt nicht auf dieser Verbindung (z.B. Stamm N).

Wenn Wachstum erfolgt, so ist dieses immer von einer charakteristischen, dunkelroten Verfärbung der Kulturflüssigkeit begleitet.

Um die rote Verbindung, die im Medium akkumuliert und nicht weiter abgebaut wird, zu isolieren, wurde ein resting cells - Versuch mit Stamm Z_8 durchgeführt. Hierzu wurde der Stamm 3 Tage lang auf 10 Petrischalen (0,1% Antipyrin® in Mineralsalzmedium) vorgezüchtet. Die gesamte Zellmasse wurde dann in einen 1l-Erlenmeyerkolben mit 500 ml Mineralsalzmedium (0,5 g Aminoantipyrin /l) überimpft. Schon nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 30°C auf der Schüttelmaschine war das Medium schmutzigbraun gefärbt und der Test auf Brenzkatechinderivate (siehe 2.8.) verlief sehr stark positiv. Nach weiteren 2 Stunden färbte sich das Medium rot. Nach insgesamt 5 Stunden wurde der Versuch abgebrochen und das Medium aufgearbeitet. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte zuerst über Sephadex LH 20 (Elution mit Äthanol 96%), die weitere Reinigung wurde mit Hilfe einer Kieselgel-Säule (Elution mit Chloroform-Äthanol-Gradient) durchgeführt.

Mengenmäßig waren folgende 3 Substanzen vorherrschend:

1. nicht umgesetztes Aminoantipyrin
2. das Brenzkatechinderivat des Aminoantipyrins
3. die unbekannte, rote Verbindung.

Das Brenzkatechinderivat wurde nicht weiter aufgearbeitet. Die rot gefärbte Verbindung wurde durch Eindampfen der entsprechenden Fraktion auf etwa 0,5 ml kristallin isoliert

und mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie (Abb.37) und IR-Spektroskopie (Abb.38) untersucht.

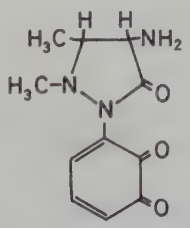
Es handelt sich um dunkelrote, sehr feine Nädelchen, die bei 189°C schmelzen und sich gut in Chloroform lösen.

Auf Dünnschichtplatten läuft die Substanz als sauber abgegrenzter Fleck, der - ohne Sprühreagenzien zu verwenden - leicht an der charakteristischen Eigenfärbung zu erkennen ist (Rf-Wert = 0,04). Auf Kieselgel-Platten mit Fluoreszenzindikator bewirkt die rote Verbindung keine Fluoreszenzlöschung (UV-Licht von 254 nm).

Im Massenspektrum erscheint bei niedriger Temperatur m/e = 235, bei höherer Temperatur m/e = 237. Dieses Phänomen läßt auf ein Chinon schließen, da von diesen Verbindungen leicht 2 Wasserstoffatome aufgenommen werden. Die ungeraden Massenzahlen deuten darauf hin, daß die Verbindung eine ungerade Zahl an Stickstoffatomen enthalten muß. Man kann davon ausgehen, daß es sich um 3 Stickstoffatome handelt, da die verwendeten Bakterien den heterozyklischen Rest nicht abbauen.

Eine o-chinoide Struktur der roten Verbindung wurde durch Reduktion mit Zinkstaub / HCl nachgewiesen: die reduzierte Verbindung ist farblos und reagiert im Brenzkatechin-Test positiv.

Aufgrund dieser Daten wird folgende Struktur postuliert:



Metabolit mit o-chinoider Struktur, entstanden aus Aminoantipyrin (bzw. dessen Brenzkatechinderivat).

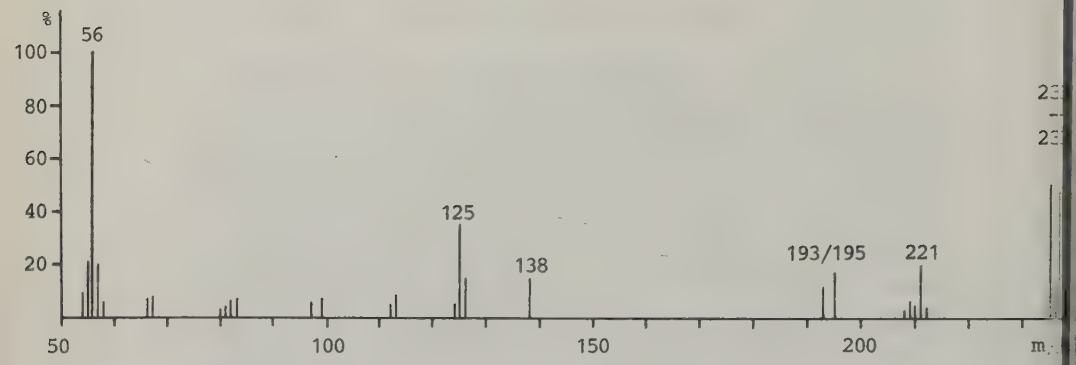


Abb.37. Massenspektrum eines o-Chinonderivats, gewonnen aus Aminoantipyrin-Kulturen.

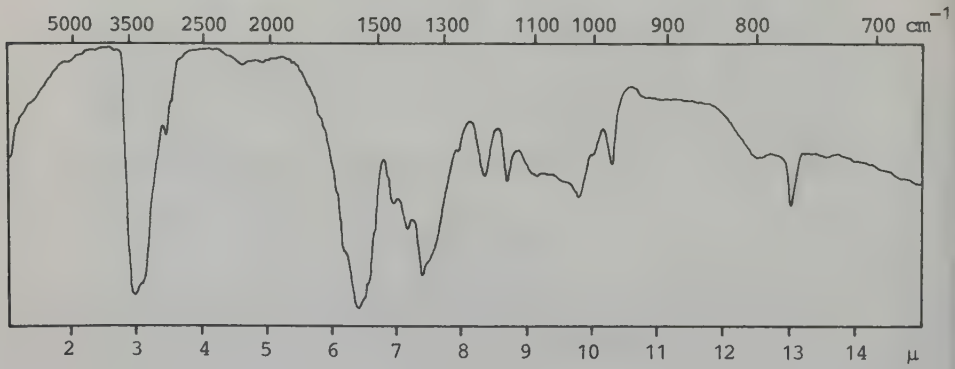


Abb.38. IR-Spektrum eines o-Chinonderivats, gewonnen aus Aminoantipyrin-Kulturen.

3.9. Suche nach weiteren, wachstumswirksamen Substraten

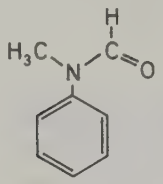
Die Beschäftigung mit den Chloridazon-abbauenden Bakterien, die bis heute ausschließlich auf synthetischen Substraten isoliert und kultiviert wurden, führt zwangsläufig sehr bald zu der zentralen Frage: Wovon leben diese Bakterien, bevor sie im Labor mit Antipyrin® oder Chloridazon in Berührung kommen? Müssen sich nicht natürlich vorkommende Kohlenstoffquellen finden lassen, die mindestens ebenso wachstumswirksam sind wie Antipyrin® oder Chloridazon? Schon FRÖHNER (1972) hatte sich besonders intensiv mit dieser Frage beschäftigt, aber keine endgültige Antwort gefunden.

Deshalb wurde dieses Problem erneut aufgegriffen. Aufbauend auf den Versuchen von FRÖHNER (1972) wurden Wachstumsversuche mit verschiedenen Substraten durchgeführt.

In der Veröffentlichung von FRÖHNER et al. aus dem Jahre 1970 wird als bestes aliphatisches Substrat Pyruvat genannt. Die Versuche wurden damals nur mit 3 Bakterienstämmen durchgeführt (Stämme R, L, E). Deshalb wurden die Pyruvat-Wachstumsversuche mit den neu isolierten Stämmen wiederholt. Die Stämme wurden in flüssiges Pyruvat-Mineralsalzmedium (50 mg / 100 ml) überimpft und das Wachstum über 4 Wochen beobachtet. Die meisten Stämme wuchsen sehr langsam an; nach 1 Woche war das Medium opaleszierend getrübt, nach 2 Wochen waren die Stämme schwach gewachsen und erreichten nach 3-4 Wochen eine optische Dichte von durchschnittlich 0,5. Einige Stämme (z.B. M_{13} und M_{16}) wuchsen überhaupt nicht. Zum Vergleich sei hier die optische Dichte in Antipyrin®-Mineralsalzmedium (ebenfalls 0,5 g /l) genannt: sie beträgt schon nach 2-3 Tagen durchschnittlich 0,65.

Versuche mit anderen aliphatischen Verbindungen (z.B. L-Glutamin, 3-Hydroxybuttersäure) führten zu noch schlechteren Ergebnissen.

Deshalb wurden als nächstes aromatische Verbindungen ausgetestet, die strukturelle Ähnlichkeit mit Antipyrin® bzw. Chloridazon haben. FRÖHNER hatte in seiner Dissertation (1972) gefunden, daß nur Verbindungen verwertet werden, bei denen ein Phenylrest über ein Stickstoffatom gebunden ist. Außerdem muß - benachbart zum Stickstoffatom - eine Carbonylgruppe vorhanden sein und das Stickstoffatom muß einen weiteren Substituenten tragen. (Das kleinste aromatische Molekül, das diese Forderungen erfüllt, ist N-Methylformanilid.)

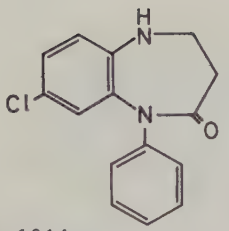


N-Methylformanilid

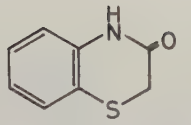
Insgesamt wurden 7 Verbindungen dieser Art, die von FRÖHNER (1972) noch nicht berücksichtigt worden waren, getestet (Abb.39). Keine der Verbindungen konnte von den Bakterien als einzige Kohlenstoffquelle verwertet werden.

Schließlich wurde in Betracht gezogen, daß die Stämme - wenn man sie z.B. auf Zuckern züchtet - außer Vitamin B_{12} irgendeinen weiteren Wachstumsfaktor benötigen könnten. Da alle Stämme aus Erde isoliert worden waren, wurden verdünnte Komplett- und Glucosemedien unter Zusatz von Erdextrakt hergestellt. Aber auch dieser Erdextrakt-Zusatz erbrachte keine Verbesserung des Wachstums.

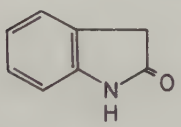
Damit schien es aussichtslos, neben Antipyrin® und Chloridazon irgendein Medium zu finden, in dem die Bakterien ebenso schnell und mit entsprechender Zellausbeute zu züchten sind. Daß dies schließlich doch noch gelang, ist den auf den folgenden Seiten beschriebenen Versuchen mit Metamitron zuzuschreiben, die primär gar nichts mit diesem Problem zu tun zu haben schienen.



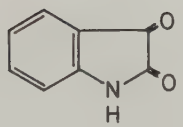
Bu 1014
Produkt der Firma Nordmark



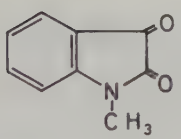
2H-1,4-Benzothiazin-3(4H)-on



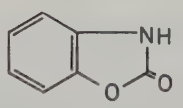
2-Indolinon



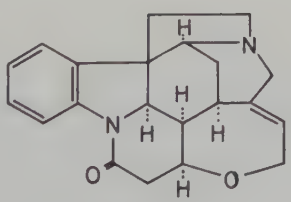
Isatin



1-Methylisatin



2-Benzoxazolinon

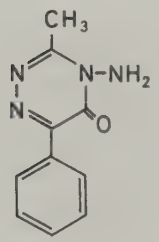


Strychnin

Abb.39. Aromatische Verbindungen, die zu Wachstumsversuchen eingesetzt wurden.

3.10. Metabolisierung von Metamitron

Das Herbizid Metamitron (Handelsname Goltix®), das von der Firma Bayer, Leverkusen, entwickelt wurde (SCHMIDT et al., 1975), ist dem Herbizid Chloridazon strukturell ähnlich und wird wie dieses zur Unkrautvernichtung auf Rübenäckern verwendet.



Metamitron

4-Amino-4,5-dihydro-3-methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5-on

Im Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim werden Versuche zum mikrobiellen Abbau dieser Verbindung durchgeführt. Es konnten allerdings bis heute aus Erde keine Mikroorganismen isoliert werden, die Metamitron als einzige Kohlenstoffquelle verwerten.

Deshalb wurde der Versuch unternommen, mit Bakterien-Reinkulturen aus der Stammsammlung des Instituts eine mikrobielle Metabolisierung von Metamitron zu erreichen. Wegen der strukturellen Verwandtschaft zwischen Metamitron und Chloridazon boten sich für diese Versuche besonders die Chloridazon-abbauenden Bakterien an.

Die Untersuchungen wurden folgendermaßen durchgeführt: Sämtliche unter 3.1. genannten Stämme wurden in einem dicken Impfstrich auf Metamitron-Mineralsalzagar (0,4 g Metamitron /l) ausgestrichen. Bereits innerhalb von 10 Minuten zeigte sich um einige Ausstriche eine Gelbfärbung des Agars, was auf eine Metabolisierung von Metamitron schließen ließ. Nach 12 Stunden war der Agar im Bereich

des Ausstrichs bei folgenden Stämmen intensiv gelb gefärbt: A_6, A_{12}, Z_5, Z_6, Z_7, Z_8, J_1, J_2, E, R, L, N, K_2, K_3, K_5. Diese Gelbfärbung nahm nach etwa 2 Wochen einen bräunlichen Ton an, die Intensität der Färbung blieb aber bestehen. Um die Ausstriche der Stämme A_{11}, A_{13}, A_{14}, M_{11}, M_{13}, M_{15}, M_{16} entstand nur eine schwache gelbe Färbung, die nach 12 Stunden wieder völlig verschwunden war.

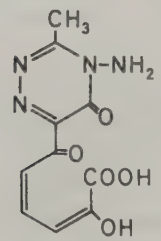
Folgende andere Stämme der Stammsammlung wurden ebenfalls ausgestrichen, zeigten aber keinerlei Farbreaktion: Achromobacter sp., Agrobacter sp., Bacillus subtilis, Escherichia coli (2 Stämme), Salmonella typhimurium, Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginosa, Arthrobacter globiformis, Nocardia rubra.

Aus diesem Versuch kann man schließen, daß die Fähigkeit zur Bildung des gelben Metamitron-Metaboliten direkt mit der Fähigkeit zum Chloridazon- bzw. Antipyrin®abbau verknüpft ist. Das negative Resultat mit 10 anderen, ganz verschiedenartigen Bakterienstämmen gibt einen Hinweis darauf, daß die Metabolisierung von Metamitron nicht auf ein unspezifisches, in vielen Bakterienarten enthaltenes Enzym zurückzuführen ist.

Analoge Versuche wurden auch in Submerskulturen durchgeführt. Bei sehr dickem Animpfen des Kulturmediums (d. h., unter resting cells-Bedingungen) färbte sich die gesamte Flüssigkeit innerhalb von Sekunden intensiv zitronengelb an. Bei dünnem Animpfen entstand primär eine schwächere Gelbfärbung, die durch geringes Wachstum innerhalb von mehreren Tagen verstärkt wurde. Wie auch bei den Versuchen auf Petrischalen ging die Gelbfärbung in allen Submerskulturen nach 1-2 Wochen in ockergelb bis braun über.

Diese Verfärbung läßt auf eine Zersetzung des gelben Metaboliten schließen. Es ist anzunehmen, daß es sich

bei der gelben Verbindung um das Metaspaltprodukt des Metamitrons handelt. (Die Verbindung verhält sich wie das Metaspaltprodukt des Biphenyls(siehe 3.11.): Säuert man eine wässrige Lösung an, so wird diese völlig entfärbt; nach Alkalizusatz kehrt die Gelbfärbung zurück.)



Metaspaltprodukt
von Metamitron

Zusammenfassend kann man aus den oben beschriebenen Versuchen folgende Schlüsse ziehen:

1. Die Chloridazon-abbauenden Bakterien sind nicht auf Metamitron als einziger Kohlenstoffquelle zu züchten.
2. Unter resting cells-Bedingungen findet jedoch eine gute Metabolisierung statt.
3. Der Abbau verläuft - mit sehr großer Wahrscheinlichkeit - analog zum Abbau des Chloridazons. Die ersten Schritte bis zur Bildung des gelben Metaspaltprodukts erfolgen sehr schnell. Die Abspaltung der aliphatischen Seitenkette vom Metaspaltprodukt ist jedoch stark behindert, was mit dem Strukturunterschied zwischen Chloridazon und Metamitron erklärt werden kann. (Im einen Fall ist der Phenylrest über ein N-Atom, im anderen Fall über ein C-Atom mit dem heterozyklischen Rest verknüpft.)

3.11. Abbau von Biphenyl

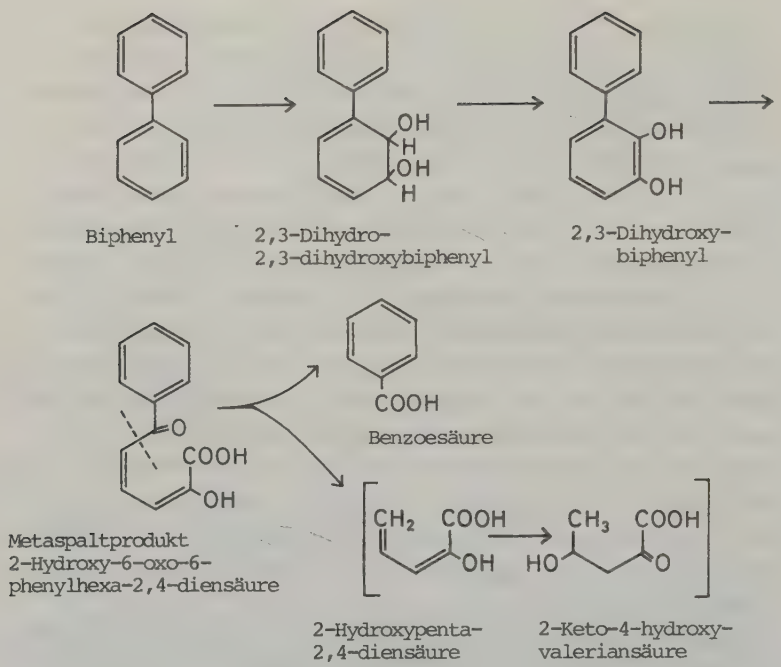
Am Beispiel des Metamitrons konnte gezeigt werden, daß die Chloridazon-abbauenden Bakterien auch Verbindungen metabolisieren können, bei denen der Phenylrest über eine C-C - Bindung gebunden ist. Es lag deshalb nahe, eine Verbindung wie Biphenyl auf ihre Verwertbarkeit zu untersuchen. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Diplom-Chemiker R. Müller durchgeführt.

Wenn man die Stämme dünn auf flüssiges Biphenyl-Mineralsalzmedium (0,1 g Biphenyl /l) animpft, dann ist nach 1-2 Wochen bei 70% aller Stämme das Medium durch sehr geringes Wachstum schwach getrübt. Gleichzeitig färbt sich das Medium gelblich an. Eine intensivere Gelbfärbung des Mediums entsteht, wenn man die Submerskulturen mit größeren Zellmengen animpft (resting cells-Versuch). Auf Petrischalen, die Biphenyl kristallin enthalten (1,0 g /l), entsteht um einen dicken Ausstrich (resting cells-Bedingungen) ein gelber Hof, der nach einigen Tagen wieder verschwindet.

Stamm N wächst von allen Stämmen am besten auf Biphenyl. Wenn man die anfängliche Substratkonzentration sehr niedrig wählt (20-40 mg Biphenyl /l) und täglich kleine Mengen an Biphenyl zugibt (5-10 mg /l), läßt sich Stamm N regelrecht auf dieser Verbindung züchten.

Parallel zu den Chloridazon-abbauenden Bakterien wurden auch 24 verschiedene Pseudomonaden aus der Stammsammlung des Instituts, darunter 17 Pseudomonas putida- Stämme, mit Biphenyl inkubiert. Keiner dieser Stämme zeigte irgendeine Reaktion.

Aus der Literatur ist bekannt, daß der mikrobielle Abbau von Biphenyl durch einen speziell isolierten Pseudomonas putida-Stamm über 2,3-Dihydroxybiphenyl mit anschließender meta-Spaltung des hydroxylierten Phenylrests erfolgt (CATELANI et al., 1973). Im nächsten



Biphenyl

2,3-Dihydro-
2,3-dihydroxybiphenyl

2,3-Dihydroxy-
biphenyl

Benzoesäure

Metaspaltprodukt
2-Hydroxy-6-oxo-6-
phenylhexa-2,4-diensäure

2-Hydroxypenta-
2,4-diensäure

2-Keto-4-hydroxy-
valeriansäure

Abb.40. Der mikrobielle Abbau von Biphenyl durch einen Pseudomonas putida-Stamm (CATELANI et al., 1973).

Schritt wird Benzoesäure abgespalten (Abb.40).

Vergleicht man diesen Abbauweg mit dem des Chloridazons (Abb.1), so fällt auf, daß die ersten Schritte bis zur Bildung des Metaspaltprodukts völlig analog verlaufen und daß die Endprodukte (2-Keto-4-hydroxy-valeriansäure) ebenfalls identisch sind. Der wesentliche Unterschied liegt in der Spaltungsweise des jeweiligen Metaspaltprodukts(in den Zeichnungen durch gestrichelte Linien

markiert): im Falle des Chloridazons (bzw. Antipyrins® und Pyramidons®) wird ein aliphatischer Rest mit 6 C-Atomen abgespalten, im Falle des Biphenyls entsteht eine C-5-Verbindung.

Es sollte deshalb untersucht werden, in welcher Weise die Chloridazon-abbauenden Bakterien Biphenyl abbauen.

3.11.1. Charakterisierung des Metaspaltprodukts von Biphenyl (2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-diensäure)

Die Untersuchung des Abbaus wurde mit resting cells durchgeführt: 30 g gewaschene Zellen des Stammes E (im 100 l - Fermentor auf Antipyrin® gezüchtet) wurden in 3 l Biphenyl-Mineralsalzmedium (1,0 g Biphenyl /l) bei 30°C und starker Belüftung inkubiert. Schon nach 1-2 Minuten färbte sich das Medium gelb; die Intensität nahm mit der Zeit zu und erreichte nach 4-5 Stunden das Maximum. Daraufhin wurde die Inkubation abgebrochen und die gelbe Verbindung nach der Vorschrift von CATELANI et al. (1973) aufgearbeitet.

Die gelbe Verbindung ist durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

- hellbraun, mikrokristallin
- $FeCl_3$ - Test positiv
- Absorptionsspektrum in Wasser
  bei pH 12 Maxima bei 435 nm
  und bei 257 nm
  bei pH 3 Maxima bei 336 nm
  und bei 263 nm
- Massenspektrum m/e 105 ($C_6H_5CO^+$)
  m/e 77 ($C_6H_5^+$)
- Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten Rf = 0,3 in dem von CATELANI et al. (1973) angegebenen Laufmittelsystem (Essigsäure-Hexan-Chloroform (10: 80:20; v/v))

Diese Daten stimmen mit den Angaben von CATELANI et al. (1973) und von CATELANI und COLOMBI (1974) sehr gut überein. Allerdings war im Massenspektrum der Molekülpeak bei m/e 218 nicht nachzuweisen. Man kann aber wohl trotzdem davon ausgehen, daß es sich bei der gelben Verbindung um das Metaspaltprodukt des Biphenyls handelt (Formel siehe Abb.40).

3.11.2. Isolierung von Benzoesäure

Die Züchtung der Zellen und der resting cells-Versuch wurden durchgeführt wie unter 3.11.1. beschrieben.

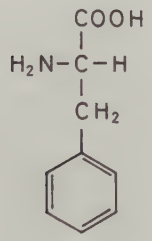
Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurde das Medium (bei pH 7,0) am Rotationsverdampfer auf ein geringes Volumen eingedampft, mit HCl auf pH 3,0 angesäuert und mit Petroläther extrahiert. Der Petrolätherauszug wurde bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Aus dem Destillat wurde Benzoesäure mit Äther ausgeschüttelt.

Die isolierte Substanz war dünnschichtchromatographisch und IR-spektrometrisch identisch mit kommerziell erhältlicher Benzoesäure.

Das Ergebnis, daß die Chloridazon-abbauenden Bakterien sogar ein Molekül abbauen können, bei dem der heterozyklische Rest durch einen Benzolkern ersetzt ist (= Biphenyl), ließ es sinnvoll erscheinen, im Folgenden auch Verbindungen mit aliphatischer Seitenkette in die Untersuchungen mit einzubeziehen. (Phenylalanin, Tyrosin, Phenylpyruvat, Zimtsäure, Mandelsäure, Phenylessigsäure, Benzoesäure.)

3.12. Wachstumsversuche mit Phenylalanin

Sämtliche unter 3.1. aufgeführten Stämme wurden in flüssiges L-Phenylalanin-Mineralsalzmedium (0,2 g L-Phe /l) dünn überimpft und bei 30°C auf der Schüttelmaschine inkubiert.



L-Phenylalanin

Erstaunlicherweise war Stamm N bereits über Nacht sehr gut gewachsen. Durch einen Ausstrich auf Komplettmedium A konnte gezeigt werden, daß es sich nicht um eine Infektion durch Fremdbakterien handelte. Die übrigen 21 Stämme waren jedoch nicht gewachsen. Erst nach einer 7 tägigen Inkubationszeit wuchs Stamm A_{12}, die meisten anderen Stämme wuchsen nach 2-3 Wochen. Einige Stämme wuchsen erst nach 8-10 Wochen, 3 Stämme wuchsen überhaupt nicht. Als der Versuch auf L-Phenylalanin-Mineralsalzagar wiederholt wurde, ließ sich schließlich doch zeigen, daß alle 22 Stämme nach einer unterschiedlich langen Inkubationszeit auf L-Phenylalanin wachsen. Überimpfte man diese Kulturen erneut auf frisches L-Phenylalanin-Medium, so wuchsen die Stämme ohne Verzögerung.

Dieses interessante Phänomen wurde über mehrere Monate hinweg eingehend untersucht und führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Die oben beschriebenen Versuche sind mit allen Stämmen reproduzierbar; Stamm N wächst grundsätzlich ohne Ver-

zögerung auf L-Phenylalanin. Alle anderen Stämme benötigen eine lag-Phase zwischen 1-10 Wochen (Durchschnittswert 2-3 Wochen)(Abb.41).

2. Während dieser wochenlangen lag-Phase bleibt das Medium völlig klar, dann setzt plötzlich gutes Wachstum ein, und der Stamm erreicht schon nach 1-2 Tagen die stationäre Phase (Abb.41).

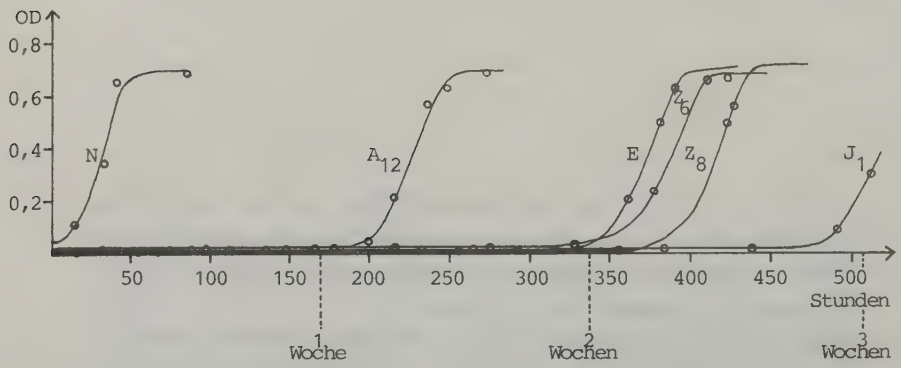


Abb.41. Wachstum in L-Phenylalanin-Mineralsalzmedium (0,5 g /l). Die Stämme wurden zum ersten Mal von Antipyrin® bzw. Chloridazon-Medien auf L-Phenylalanin überimpft. Die in der Zeichnung dargestellte Reihenfolge des Wachstums ist reproduzierbar. Stamm N wächst ohne Verzögerung, dann folgt als 2.Stamm grundsätzlich A_{12}, die meisten anderen Stämme wachsen in der 3.Woche. Einzelne Stämme wachsen erst nach mehreren Wochen (z.B. A_{11}, A_{13}, A_{14} und die über Pyramidon selektionierten Stämme).

3. Ist ein Stamm einmal auf L-Phenylalanin gewachsen, läßt er sich bei allen folgenden Transfers ohne Verzögerung auf L-Phenylalanin züchten (Abb.42, II).

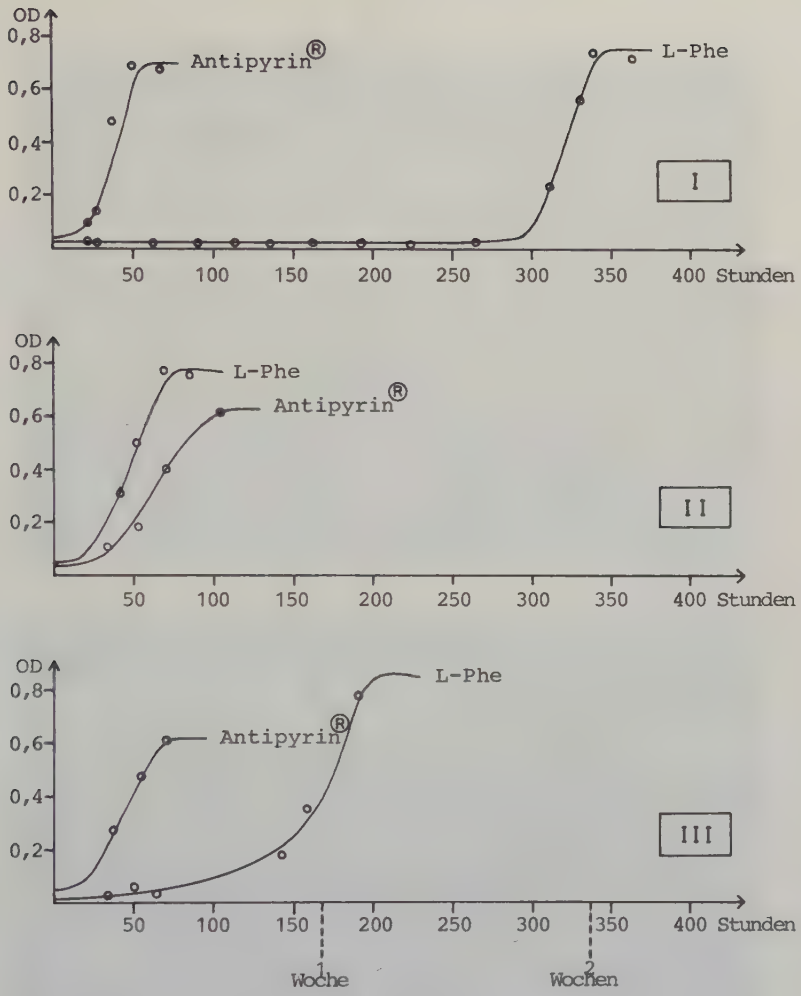


Abb.42. Wachstum in Antipyrin® und L-Phenylalanin-Mineralsalzmedien (jeweils 0,5 g /l).

Alle Versuche wurden mit demselben Stamm durchgeführt, der allerdings auf 3 verschiedene Arten vorgezüchtet worden war.

I Stamm A_6, bis zum Beginn dieses Versuchs nie auf L-Phe gewachsen.

II Stamm A_6, mehrere Monate auf L-Phe kultiviert.

III Stamm A_6, mehrere Monate auf L-Phe und dann wieder 1 Monat lang auf Antipyrin® kultiviert.

Ab dem 2.Transfer ist L-Phenylalanin in Bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit und Zellausbeute den Substraten Antipyrin® und Chloridazon völlig gleichwertig oder sogar überlegen.

4. Züchtet man einen Stamm, der mehrere Monate ausschließlich auf L-Phenylalanin-Medium kultiviert wurde, wieder einige Wochen auf Antipyrin® oder Chloridazon, so tritt beim erneuten Überimpfen auf L-Phenylalanin wiederum eine Wachstumsverzögerung ein (Abb.42, III). Diese Verzögerung kann minimal sein, sie kann aber auch der lag-Phase beim allerersten Transfer auf L-Phenylalanin entsprechen.
5. Züchtet man einen Stamm mehrere Monate auf L-Phenylalanin, so kann die Fähigkeit zum Antipyrin®abbau verlorengehen (beobachtet bei den Stämmen K_2, K_3 und L).

Es stellte sich nun die Frage: Was geschieht während der zum Teil wochenlangen lag-Phase? Wird die Fähigkeit zum Wachstum auf L-Phenylalanin durch Induktion oder durch Mutation erworben?

Zur Abklärung dieses Problems wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Ausstriche auf L-Phenylalanin-Mineralsalzagar

Alle 22 Stämme, die vorher nie auf L-Phenylalanin gezüchtet worden waren, wurden dünn auf L-Phenylalanin-Mineralsalzagar ausgestrichen.

Während Stamm N nach 3-4 Tagen in Form eines normalen, gleichmäßig-cremigen Ausstrichs gewachsen war, zeigten die meisten anderen Stämme charakteristische, unregelmäßige Wachstumsbilder (Abb.43). Man sieht auf den Fotografien deutlich, daß einzelne Kolonien gut, andere nur sehr schwach gewachsen sind. Streicht man nun Zellen aus den gut gewachsenen Bereichen erneut auf L-Phenylalanin-Mineralsalzagar aus, so wachsen die Kulturen gut und schnell weiter. Streicht man Zellen aus den dünn gewach-

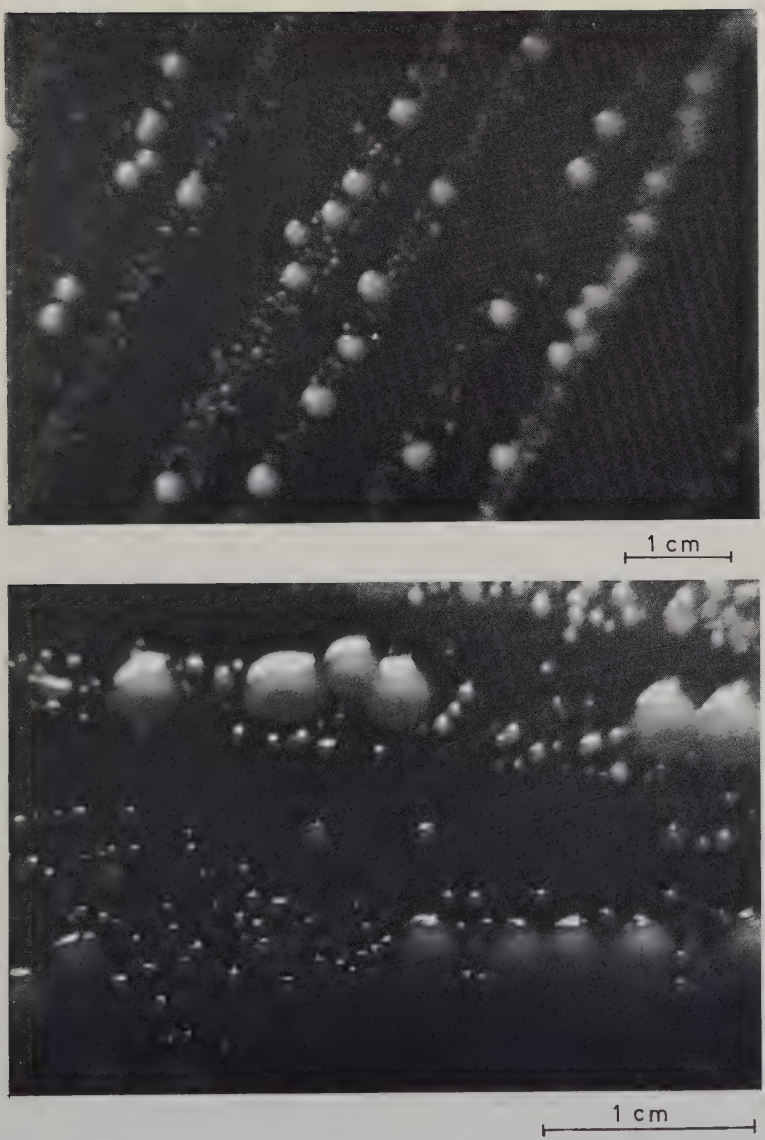


Abb.43. Beide Fotografien: Stamm L, zum ersten Mal auf L-Phenylalanin-Mineralsalzagar ausgestrichen.

senen Bereichen aus, so entwickeln sich diese Kulturen erst nach der für diesen betreffenden Stamm charakteristischen Verzögerungsphase.

2. Lederbergstempeltechnik auf Chloridazon- und auf L-Phenylalanin-Agarplatten

2 verschiedene Stämme (Z_7 und Z_8) wurden auf Chloridazon-Platten ausplattiert und die Einzelkolonien mit Hilfe eines Lederbergstempels auf Chloridazon- und L-Phenylalanin-Platten übertragen. Die Kolonien auf den Chloridazon-Platten entwickelten sich innerhalb weniger Tage gut, während auf den L-Phenylalanin-Platten in den ersten 2 Wochen kein Wachstum zu beobachten war. Nach 6 wöchiger Inkubationszeit waren jedoch alle Kolonien auf den L-Phenylalanin-Platten gewachsen und ließen sich bei weiteren Transfers ohne Verzögerung auf L-Phenylalanin züchten.

Die Resultate der beiden oben beschriebenen Versuche sind widersprüchlich: Bei einem einfachen Ausstrich wächst nur ein kleiner Teil der Kolonien, beim Stempeln von Einzelkolonien entwickeln sich dagegen alle Kolonien gleichmäßig.

Vielleicht kann man diesen Widerspruch damit erklären, daß auch innerhalb einer überstempelten Einzelkolonie nur ein gewisser Prozentsatz der Zellen auf L-Phenylalanin wächst und sich dann entsprechend vermehrt.

Die Frage: "Induktion oder Mutation?" ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht endgültig klären.

Von einer Induktion im klassischen Sinn kann man wohl nicht sprechen, da

1. die Induktionszeiten zu lang sind,
2. alle Zellen gleichzeitig induziert werden müßten.

(Daß dies nicht der Fall ist, beweist Abb.43.)

Eine Mutation im klassischen Sinn liegt aber auch nicht vor, da

1. die Mutationsrate für eine Spontanmutation viel zu hoch ist (siehe Abb.43),
2. die Länge der lag-Phase für jeden Stamm eine Konstante darstellt und immer wieder reproduzierbar ist.

Eine endgültige Interpretation der in diesem Kapitel beschriebenen Beobachtungen wird sich wohl nur durch sehr eingehende enzymatische Untersuchungen geben lassen.

Untersuchungen zum Abbauweg von L-Phenylalanin durch die Chloridazon-abbauenden Bakterien wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Erste Hinweise auf einen möglichen Abbauweg lieferten folgende Beobachtungen:
1. Alle Stämme lassen sich auf L-Phenylalanin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle züchten. (Die Stickstoffatome der Substrate Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon werden nicht verwertet.) Damit ist bewiesen, daß beim Abbau von L-Phenylalanin - im Gegensatz zum üblichen Abbauschema (Abb.1) - auch die Seitenkette angegriffen wird.
2. Auf L-Phenylalanin-Agarplatten ist manchmal ein gelblicher Hof um die Ausstriche zu beobachten. Eine entsprechende Gelbfärbung auf Metamitron- oder Biphenyl-Platten ließ sich in beiden Fällen auf eine Verbindung zurückführen, die durch meta-proximale Spaltung der jeweiligen 2,3-Dihydroxy-verbindung entstanden war. Dies läßt vermuten, daß auch der Abbau von L-Phenylalanin über L-2,3-Dihydroxyphenylalanin verläuft.

Versuche zum Abbau von D-Phenylalanin wurden mit Stamm N durchgeführt.

Der Stamm wächst nicht auf D-Phenylalanin. Wenn das Medium 2 Teile D-Phenylalanin und 1 Teil L-Phenylalanin enthält, wird das Wachstum (d.h., der Abbau von L-Phenylalanin) vollkommen gehemmt.

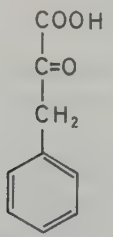
3.13. Wachstumsversuche mit L-Tyrosin (L-4-Hydroxyphenylalanin)

Alle Stämme wurden sowohl auf Antipyrin® bzw. Chloridazon als auch auf L-Phenylalanin vorgezüchtet und dann in L-Tyrosin-Mineralsalzmedium (0,2 g L-Tyr /l) überimpft.

Auch nach mehrwöchiger Inkubationszeit wuchs keiner der Stämme in diesem Medium.

3.14. Abbau von Phenylpyruvat

Phenylpyruvat ist eine labile Verbindung, die für Wachstumsversuche nur begrenzt einsetzbar ist. Man muß davon ausgehen, daß sich die Verbindung auf der Schüttelmaschine bei 30°C relativ schnell zersetzt. Wenn Wachstum auftritt, so können dafür auch Zersetzungsprodukte verantwortlich sein (z.B. Phenylessigsäure).



Phenylpyruvat

= Phenylbrenztraubensäure

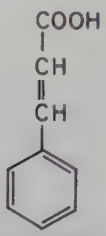
Wachstumsversuche mit Phenylpyruvat (0,2 g /l) wurden sowohl in Submerskultur als auch auf Agarplatten durchgeführt. In Submerskultur wuchs ein großer Teil der Stämme gut innerhalb von 1-2 Tagen. Auf Petrischalen war das Wachstum ebenfalls gut. (Die Wachstumswirksamkeit von Antipyrin® oder Chloridazon wird durch Phenylpyruvat allerdings nicht erreicht.) Um alle Ausstriche war nach 1 Tag ein gelber Hof entstanden, der nach weiteren 3 Tagen wieder verschwunden war.

Die gelbe Verbindung wurde nicht isoliert; es ist aber zu vermuten, daß es sich auch hier wieder um das entsprechende Metaspaltprodukt handelt. In diesem Fall müßte der Abbau von Phenylpyruvat über ein Brenzkatechinderivat verlaufen.

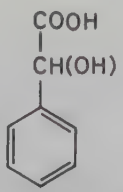
Um eine solche Verbindung nachzuweisen, wurde folgender Versuch durchgeführt: Die Bakterien wurden dick auf Phenylpyruvat-Platten ausgestrichen und nach einer Inkubationszeit von 14 Stunden wieder von den Petrischalen abgekratzt. Der Agar wurde dann durch ein feines Sieb gepreßt, mit Wasser eluiert und das Eluat am Rotationsverdampfer auf wenige Milliliter eingedampft. Mit diesem Konzentrat wurde der Test auf Brenzkatechinderivate (siehe 2.8.) durchgeführt. Der Test war schwach, aber ganz eindeutig positiv. Damit war nachgewiesen, daß beim Abbau ein Brenzkatechinderivat auftritt. Es ist anzunehmen, daß Phenylpyruvat wie Antipyrin® und Chloridazon in 2,3-Stellung hydroxyliert wird.

3.15. Wachstumsversuche mit Zimtsäure und Mandelsäure Abbau von Zimtsäure

Beide Substrate werden nicht gut verwertet. Viele Stämme wachsen auf diesen Verbindungen erst nach 2-3 Wochen. Bei weiteren Transfers findet dann oft überhaupt kein Wachstum mehr statt. Insgesamt gesehen ist Zimtsäure ein etwas besseres Substrat als Mandelsäure.



Zimtsäure

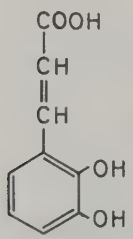


DL-Mandelsäure

Der interessanteste Befund bei dieser Versuchsreihe war, daß durch Stamm N das Brenzkatechinderivat der Zimtsäure in größeren Mengen akkumuliert wird. Züchtet man Stamm N in flüssigem Zimtsäure-Mineralsalzmedium, so färbt sich das Medium nach 1-2 Tagen schmutzigbraun an und der Test auf Brenzkatechinderivate (siehe 2.8.) ist sehr stark positiv.

Das Brenzkatechinderivat wurde durch Säulenchromatographie (Sephadex LH 20 / Äthanol 96%) isoliert und die kristalline Reinsubstanz für spektroskopische Untersuchungen eingesetzt (Abb.44-46).

Folgende Struktur wird vorgeschlagen:



Brenzkatechinderivat der Zimtsäure

= 2,3-Dihydroxyzimtsäure

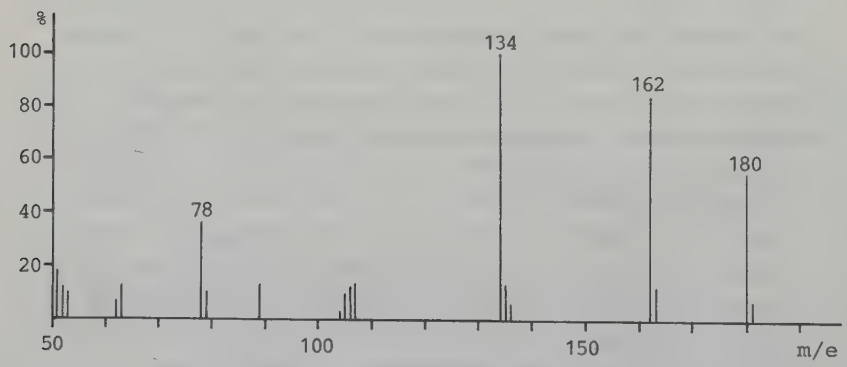


Abb.44. Massenspektrum des Brenzkatechinderivats der Zimtsäure.

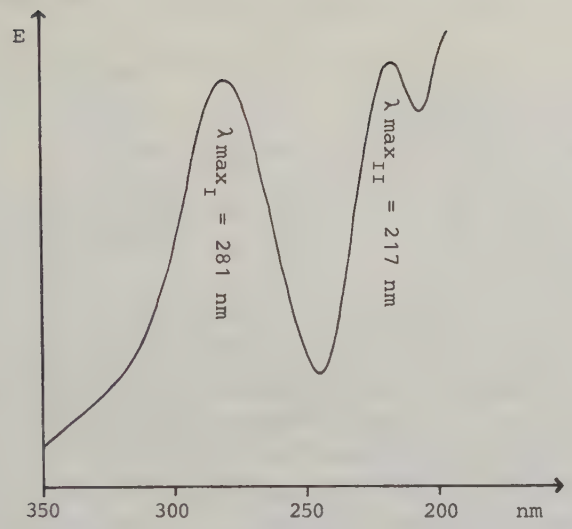


Abb.45. UV-Spektrum des Brenzkatechinderivats der Zimtsäure (in Wasser).

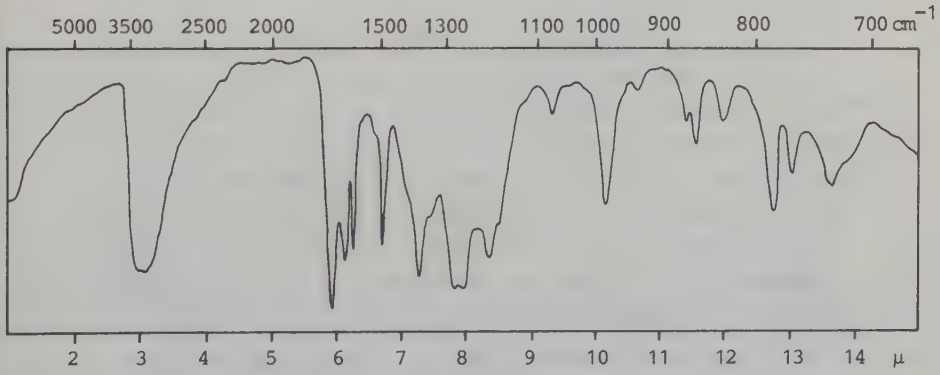
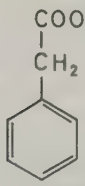
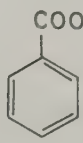


Abb.46. IR-Spektrum des Brenzkatechinderivats der Zimtsäure.

3.16. Wachstumsversuche mit Phenylessigsäure und Benzoesäure



Phenylessigsäure



Benzoesäure

Phenylessigsäure wird von den einzelnen Stämmen unterschiedlich gut verwertet. Einige Stämme (A_{11}, A_{13}, A_{14}, M_{11}, M_{13}, M_{15}, M_{16}) wachsen überhaupt nicht auf Phenylessigsäure. Die meisten anderen Stämme wachsen zwar schnell an, benötigen dann aber 2-3 Wochen, um voll auszuwachsen. Lediglich Stamm N ist nach 1 wöchiger Inkubationszeit gut auf Phenylessigsäure gewachsen.

Stämme, die längere Zeit nur auf L-Phenylalanin gezüchtet wurden, bauen Phenylessigsäure schneller ab als diejenigen Stämme, die immer auf Antipyrin® oder Chloridazon gezüchtet wurden.

Streicht man die Stämme in einem dicken Impfstrich auf Phenylessigsäure-Platten aus (resting cells-Versuch), so tritt nach 1 Stunde im Bereich des Ausstrichs eine schwache Gelbfärbung auf. Diese Färbung ist nach 24 Stunden wieder völlig verschwunden. Die Gelbfärbung gibt einen Hinweis darauf, daß auch Phenylessigsäure über 2,3-Dihydroxy-phenylessigsäure abgebaut wird. Das im nächsten Schritt gebildete Metaspaltprodukt ist auf den Agarplatten durch seine gelbe Färbung zu erkennen.

Benzoesäure wird auch nach sehr langen Inkubationszeiten (6 Wochen) von keinem der Stämme angegriffen.

4. Diskussion

4.1. Isolierung und Charakterisierung der Stämme

In der vorliegenden Arbeit wird über die Isolierung von 13 Bakterienstämmen berichtet, welche die besondere Fähigkeit haben, die 3 strukturanalogen Verbindungen Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon abzubauen und Teile des Moleküls als einzige Kohlenstoffquelle zum Wachstum zu verwerten.

Die morphologische und physiologische Untersuchung der neuisolierten Stämme ergab, daß alle 13 Stämme untereinander sehr ähnlich sind. Auch mit den über Chloridazon selektionierten Bakterienstämmen aus der Stammsammlung des Instituts besteht eine so weitgehende Übereinstimmung, daß man sämtliche Stämme einer einzigen Gattung zuordnen kann.

Die eingangs gestellte Frage, ob die Selektionierung mit Antipyrin® oder Pyramidon® zu anderen Mikroorganismen führt als die Selektionierung mit Chloridazon, kann eindeutig verneint werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß es im Boden nur eine einzige Bakteriengattung gibt, die auf Antipyrin®, Pyramidon® oder Chloridazon als einziger Kohlenstoffquelle wächst.

Dagegen kann man natürlich einwenden, daß alle Stämme nach einem einheitlichen Selektionsverfahren isoliert wurden und daß eine Variation der Bedingungen (z.B. Änderung von pH, Ionenstärke, Temperatur) zu anderen Mikroorganismen führen könnte. Einen Gegenbeweis dafür liefert aber die Arbeit von ENGVILD und JENSEN (1969), in der dieselben Bakterien (Stämme J_1 und J_2) isoliert worden waren, obwohl die Selektionsbedingungen deutlich differierten.

4.2. Systematische Klassifizierung

Von dem Zeitpunkt an, als FRÖHNER et al. (1970) die erste Reinkultur eines Chloridazon-abbauenden Bakterienstammes isoliert hatten, stellte sich die Frage nach der taxonomischen Einordnung dieser Bakterien.

Im Jahre 1970 hatten FRÖHNER et al. eine vorläufige Einordnung in die Gattung Acinetobacter vorgeschlagen. (Die Klassifizierung wurde damals mit 3 Stämmen anhand der 7.Auflage von Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology durchgeführt.)

Da im Laufe der Jahre weitere Erkenntnisse über die Chloridazon-abbauenden Bakterien gewonnen wurden, die Zahl der Stämme auf 22 angewachsen war und außerdem eine neue Auflage von Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology erschien, wurde im Rahmen dieser Arbeit erneut der Versuch einer taxonomischen Einordnung unternommen. Wie zu erwarten, traten dabei einige Schwierigkeiten auf.

Betrachtet man die 19 Teile von Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology, so kommen für eine Einordnung Teil 7 (Gram-negative aerobe Stäbchen und Kokken) und Teil 10 (Gram-negative Kokken und Kurzstäbchen) am ehesten in Frage. Im Teil 10 stößt man wieder auf die von FRÖHNER et al. (1970) vorgeschlagene Gattung Acinetobacter. Nach dem heutigen Stand der Erkenntnisse muß diese Gattung aber ausgeschlossen werden (GC-Verhältnis für Acinetobacter 40-47 Mol%, für die Chloridazon-abbauenden Bakterien 58 Mol%). Im Teil 7 findet man eine recht weitgehende Übereinstimmung mit der Gattung Pseudomonas. Laut Bergey´s Manual darf ein Bakterium jedoch nur als Pseudomonas sp. klassifiziert werden, wenn es beweglich ist. Da diese Bedingung von den Chloridazon-abbauenden Bakterien nicht erfüllt wird, kommt auch eine Einordnung in die Gattung Pseudomonas nicht in Frage.

Die übrigen Gattungen der Teile 7 und 10 zeigen noch weniger Übereinstimmung mit den neu isolierten Bakterien.

Da keine der heute bekannten Bakteriengattungen die typischen Eigenschaften der Chloridazon-abbauenden Bakterien aufweist, muß man davon ausgehen, daß es sich um eine neue, noch nicht in Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology erfaßte Gattung handelt. Wahrscheinlich wurde dieses Bakterium bis jetzt noch nicht in Bergey´s Manual beschrieben, weil es sich offensichtlich nur mit Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon isolieren läßt. Alle Versuche, diese Bakterien mit einem anderen Substrat (z.B. L-Phenylalanin) zu selektionieren, schlugen fehl (TITTMANN, 1977).

4.3. Wachstumsansprüche

Das hervorstechende Merkmal der Chloridazon-abbauenden Bakterien sind deren ungewöhnliche Wachstumsansprüche.

Die Stämme wachsen weder auf normal konzentrierten Komplettmedien noch auf einfachen, definierten Verbindungen wie Zuckern und Alkoholen. Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich 2 synthetische Substrate bekannt (Antipyrin® und Chloridazon), auf denen die Bakterien gut und schnell zu züchten sind. Diese Tatsache hatte von Anfang an die Frage nach einem "natürlichen" Substrat aufgeworfen. Wovon leben diese ubiquitär verbreiteten Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung?

Schon FRÖHNER (1972) war dieser Frage nachgegangen und hatte eine sehr große Anzahl von Substraten auf ihre Wachstumswirksamkeit untersucht. In seiner Dissertation kam er zu dem Schluß, daß die absolut notwendige "Minimalstruktur" N-Methylformanilid ist.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden deshalb Verbindungen, bei denen der Phenylrest über eine C-C-Bindung verknüpft ist, für Wachstumsversuche gar nicht erst in Betracht gezogen.

Mehr oder weniger durch einen Zufallsbefund am Rande,

nämlich durch die Metabolisierungsversuche mit Metamitron, wurde klar, daß doch auch C-C-verknüpfte Phenylreste metabolisiert werden können. Folgerichtig wurde der heterozyklische Rest im nächsten Schritt durch eine Phenylgruppe (Biphenyl) und dann auch durch aliphatische Reste ersetzt (L-Phenylalanin, Phenylpyruvat, Zimtsäure usw.). Auf diese Weise wurde die Wachstumswirksamkeit von L-Phenylalanin gefunden.

Es ist leicht zu verstehen, warum FRÖHNER (1972) dies noch nicht hatte feststellen können: lediglich Stamm N wächst ohne Verzögerung auf L-Phenylalanin, und diesen Stamm hatte FRÖHNER im Jahre 1970 noch nicht zur Verfügung.

Das merkwürdige Phänomen der oft wochenlangen lag-Phasen beim Abbau von L-Phenylalanin konnte bis jetzt noch nicht interpretiert werden.

Das Auftreten dieser langen lag-Phasen läßt auch daran zweifeln, ob L-Phenylalanin das lang gesuchte "natürliche" Substrat ist.

Man sollte wohl eher davon ausgehen, daß es das "natürliche" Substrat überhaupt nicht gibt, sondern daß die Stämme im Boden von einer komplexen Mischung aus verschiedensten Verbindungen leben.

4.4. Abbauwege

Der für Chloridazon und Antipyrin gültige Abbauweg (S.10) konnte auch für Pyramidon® bestätigt werden. Somit werden alle 3 Substrate in derselben Weise abgebaut: durch Angriff einer Dioxygenase wird die jeweilige 2,3-Dihydro-dihydroxy-verbindung gebildet, die durch eine Dehydrogenase (bzw.Dehydrogenasen) zur 2,3-Dihydroxy-verbindung oxidiert wird. Im nächsten Schritt erfolgt eine meta-proximale Spaltung des Phenylrests. Die damit entstandene aliphatische Seitenkette wird darauf vom

heterozyklischen Rest abgespalten und schließlich als Kohlenstoffquelle genutzt. Der heterozyklische Anteil des Moleküls wird bei allen 3 oben genannten Substraten nicht metabolisiert.

Der Abbau von Aminoantipyrin und Metamitron verläuft analog, die Wachstumsgeschwindigkeit ist jedoch sehr stark verringert, da bei beiden Substraten Zwischenprodukte des Abbaus akkumuliert werden.

Man kann davon ausgehen, daß bei L-Phenylalanin, Phenylpyruvat, Zimtsäure und Phenylessigsäure die ersten Abbauschritte bis zur Bildung des Metaspaltprodukts analog zum oben beschriebenen Abbauweg verlaufen. Es ist aber anzunehmen, daß sich die darauffolgenden Schritte wesentlich vom Abbau des Chloridazons unterscheiden, da die jeweilige aliphatische Seitenkette mit einiger Sicherheit auch in den Abbau einbezogen wird.

Biphenyl wird ebenfalls in 2,3-Stellung hydroxyliert und dann durch eine Metapyrocatechase (bzw. Metapyrocatechasen) gespalten. Der dann folgende Schritt entspricht nicht dem üblichen Schema des Chloridazonabbaus (S.10), sondern verläuft entsprechend dem von CATELANI et al. (1973) formulierten Abbauschema (S.74).

Die Ergebnisse der Abbauversuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Die Chloridazon-abbauenden Bakterien metabolisieren bevorzugt einfach substituierte Benzolkerne. Als Substituenten sind nicht nur heterozyklische Reste, sondern auch aliphatische Reste mit 2-3 Kohlenstoffatomen geeignet. Die 3 wachstumswirksamsten Verbindungen sind Antipyrin®, Chloridazon und - nach einer sehr langen lag-Phase - auch L-Phenylalanin.

5. Zusammenfassung

Aus 34 Erdproben, denen als einzige Kohlenstoffquelle Antipyrin®, Pyramidon® oder das Herbizid Chloridazon zugesetzt worden war, konnten nach mehrmonatiger Inkubationszeit 13 Bakterienstämme in Reinkultur isoliert werden. Alle 13 Stämme wachsen auf Antipyrin® als einziger Kohlenstoffquelle. Die strukturanalogen Verbindungen Pyramidon® und Chloridazon werden nur von einem Teil der Stämme abgebaut.

Die neu isolierten Stämme stimmen mit den Bakterien, die in früheren Jahren mit Chloridazon aus europäischen, amerikanischen und afrikanischen Böden isoliert worden waren, in den wichtigsten morphologischen und physiologischen Eigenschaften so weitgehend überein, daß man sämtliche Stämme einer einzigen Gattung zuordnen kann. Durch die Behandlung von Erde mit den 3 Substraten Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon wird offensichtlich ganz selektiv ein bestimmtes, ubiquitär verbreitetes Erdbakterium angereichert. Dieses Bakterium ließ sich bis jetzt nicht taxonomisch anhand von Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology klassifizieren. Deshalb wird vorgeschlagen, für diese Bakterien eine neue Gattung einzurichten.

Das hervorragendste Merkmal dieser Bakterien sind die spezifischen Wachstumsansprüche, auf deren Untersuchung im Verlauf dieser Arbeit besonderen Wert gelegt wurde.

Außer Antipyrin®, Pyramidon® und Chloridazon erwiesen sich folgende Verbindungen als mehr oder weniger wachstumswirksam: Aminoantipyrin, L-Phenylalanin, Phenylpyruvat, Zimtsäure, Mandelsäure und Phenylessigsäure. Die Wachstumswirksamkeit von Antipyrin® und Chloridazon wird nur von L-Phenylalanin erreicht. Besonders hervorzuheben

ist, daß L-Phenylalanin von fast allen Stämmen beim ersten Überimpfen auf dieses Substrat erst nach einer 2-3 wöchigen lag-Phase abgebaut wird.

In resting cells - Versuchen werden von den Bakterien auch Biphenyl und das zum Herbizid Chloridazon strukturanaloge Herbizid Metamitron metabolisiert; jedoch können diese Substrate nicht als einzige Kohlenstoffquelle zum Wachstum genutzt werden.

Pyramidon® wird von den Bakterien in derselben Weise abgebaut wie Antipyrin® und Chloridazon. (Aus Pyramidon®-Kulturen wurden als Metaboliten 2,3-Dihydroxypyramidon® und der entphenylierte Pyramidon®-Heterozyklus isoliert.)

Durch diese Wachstumsversuche ließ sich also zeigen, daß als Substrate bevorzugt einfach substituierte Benzolringe verwertet werden. Als Substituenten sind geeignet:

1. Heterozyklen vom Typ Pyridazinon (Chloridazon), Pyrazolon (Antipyrin®, Pyramidon®) oder Triazinon (Metamitron)
2. ein zweiter Benzolkern (Biphenyl)
3. aliphatische Reste mit 2-3 Kohlenstoffatomen.

Der Abbau aller Substrate erfolgt in den ersten Schritten immer in gleicher Weise, nämlich durch oxidativen Angriff des Benzolkerns in 2,3-Position mit anschließender meta-proximaler Spaltung.

6. Literaturverzeichnis

ARNOW, L.E.: Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. J. biol.Chem. 118, 531-537 (1937).

BLOBEL, F., J.EBERSPÄCHER, S.HAUG und F.LINGENS: Enzymatische Bildung eines Muconsäurederivates mit Hilfe Pyrazon-abbauender Bakterien. Z.Naturforsch. 31c, 756 (1976a).

BLOBEL, F., J.EBERSPÄCHER und F.LINGENS: Enzymatische Bildung von 2-Keto-4-hydroxyvaleriansäure mit Hilfe von Pyrazon-abbauenden Bakterien. Z.Naturforsch. 31c, 757 (1976b).

BUCHANAN, R.E. and N.E. GIBBONS (ed.): Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.: The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974).

CATELANI, D. and A.COLOMBI: Metabolism of Biphenyl. Structure and Physicochemical Properties of 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic Acid, the Meta-cleavage Product from 2,3-Dihydroxybiphenyl by Pseudomonas putida. Biochem.J. 143, 431-434 (1974).

CATELANI, D., A.COLOMBI, C.SORLINI and V.TRECCANI: Metabolism of Biphenyl. 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate: The Meta-cleavage Product from 2,3-Dihydroxybiphenyl by Pseudomonas putida. Biochem.J. 134, 1063-1066 (1973).

CONN, H.J. (ed.): Manual of Microbiological Methods by the Society of American Bacteriologists: McGraw-Hill, New York (1957).

DE FRENNE, E., J.EBERSPÄCHER and F.LINGENS: The Bacterial Degradation of 5-Amino-4-chloro-2-phenyl-3(2H)-pyridazinone. Eur.J.Biochem. 33, 357-363 (1973).

EBERSPÄCHER, J. und F.LINGENS: Reinigung und Eigenschaften von zwei Chloridazondihydrodiol-Dehydrogenasen aus Chloridazon-abbauenden Bakterien. Hoppe-Seyler´s Z.Physiol.Chem. 359, 1323-1334 (1978).

ENGVILD, K.C. and H.L.JENSEN: Microbiological Decomposition of the Herbicide Pyrazon. Soil Biol.Biochem. 1, 295-300 (1969).

FRÖHNER, C., O.OLTMANNS und F.LINGENS: Isolierung und Charakterisierung Pyrazon-abbauender Bakterien. Arch.Mikrobiol. 74, 82-89 (1970).

FRÖHNER, C.: Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau des Herbizids Pyrazon und anderer aromatischer Verbindungen. Dissertation, Universität Hohenheim (1972).

HAUG, S., J.EBERSPÄCHER and F.LINGENS: Enzymatic and Chemical Preparation of 5-Amino-4-chloro-2-(2,3-dihydroxyphen-1-yl)-3(2H)-pyridazinone. Biochem. Biophys.Res.Commun. 54, 760-763 (1973).

KING, E.O., M.K.WARD and D.E.RANEY: Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Fluorescin. J.Lab.Clin.Med. 44, 301-307 (1954).

LINGENS, F., R.BLECHER, H.BLECHER und U.KOCH: Isolierung Chloridazon-abbauender Bakterien aus ostafrikanischen Bodenproben (Kenia). Z.Pflanzenkrankh. Pflanzensch. 84, 684-690 (1977).

MÜLLER, R.: Zum mikrobiellen Abbau von 5-Amino-4-chlor-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-3(2H)-pyridazinon. Dissertation, Universität Hohenheim (1977).

MÜLLER, R., S.HAUG, J.EBERSPÄCHER und F.LINGENS: Catechol-2,3-Dioxygenase aus Pyrazon-abbauenden Bakterien. Hoppe-Seyler´s Z.Physiol.Chem. 358, 797-805 (1977).

SAUBER, K., C.FRÖHNER, G.ROSENBERG, J.EBERSPÄCHER and F.LINGENS: Purification and Properties of Pyrazon Dioxygenase from Pyrazon-Degrading Bacteria. Eur.J.Biochem. 74, 89-97 (1977a).

SAUBER, K., R.MÜLLER, E.KELLER, J.EBERSPÄCHER und F.LINGENS: Abbau von Antipyrin durch Pyrazon-abbauende Bakterien. Z.Naturforsch. 32c, 557-562 (1977b).

SCHMIDT, R.R., W.DRABER, L.EUE and H.TIMMLER: Herbicidal Activity and Selectivity of New 3-Alkyl-4-amino-6-aryl-1,2,4-triazin-5-ones. Pestic.Sci. 6, 239-244 (1975).

TITTMANN, U.: Isolierung und Charakterisierung Phenylalanin-abbauender Bakterien. Diplomarbeit, Universität Hohenheim (1977).

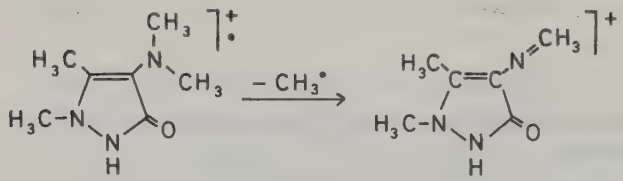
A N H A N G

1. Interpretation der Massenspektren

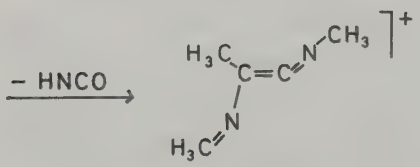
1.1. Heterozyklus von Pyramidon® (Spektrum siehe S.62)

Das Molekulargewicht des entphenylierten Heterozyklus von Pyramidon® beträgt 155. Dementsprechend findet man im Spektrum als Peak mit der höchsten Masse m/e 155 (Molekül-Ion).

Die beiden ersten Fragmentierungsschritte können folgendermaßen gedeutet werden:



m/e 155 m/e 140



m/e 97

1.2. Brenzkatechinderivat von Pyramidon® (Spektrum siehe S.59)

Das Molekül-Ion m/e 263 entspricht dem Molekulargewicht des Brenzkatechinderivats von Pyramidon®. Die einzelnen Fragmentierungsschritte konnten hier nicht eindeutig interpretiert werden.

1.3. o-Chinonderivat, gewonnen aus Aminoantipyrin (Spektrum siehe S.66)

Interpretation des Massenspektrums und Vorschlag einer Struktur siehe S.65.

1.4 Brenzkatechinderivat der Zimtsäure (Spektrum siehe S.86)

Das Molekulargewicht des Brenzkatechinderivats der Zimtsäure beträgt 180. Dementsprechend findet man im Spektrum als Peak mit der höchsten Masse m/e 180 (Molekül-Ion).

Es wird folgendes Fragmentierungsmuster vorgeschlagen:

$$\text{m/e 180} \xrightarrow{-\ H_2O} \text{m/e 162} \xrightarrow{-\ CO} \text{m/e 134}$$

2. Interpretation der Infrarot-Spektren

2.1. Heterozyklus von Pyramidon® (Spektrum siehe S.63)

Charakteristische Banden bei:

3370 cm^{-1} (OH)
1630 cm^{-1} (C=O)
1520 cm^{-1} (C=C)
1490 cm^{-1} (C=C)
1440 cm^{-1} (C=C)

2.2. Brenzkatechinderivat von Pyramidon® (Spektrum siehe S.60)

Charakteristische Banden bei:

3340 cm^{-1} (OH)
2900 cm^{-1} (CH_3)
2760 cm^{-1} ( )
1610 cm^{-1} (C=O)
Bereich 1490-1430 cm^{-1} (C=C)

2.3. o-Chinonderivat, gewonnen aus Aminoantipyrin (Spektrum siehe S.66)

Charakteristische Banden bei:

3340 cm^{-1} (OH)

1560 cm^{-1} (C=O)?

2.4. Brenzkatechinderivat der Zimtsäure (Spektrum siehe S.87)

Charakteristische Banden bei:

3280 cm^{-1} (OH)

1680 cm^{-1} (COOH)

1620 cm^{-1} (C=C)

1590 cm^{-1} (C=C)

1480 cm^{-1} (C=C)

Lebenslauf

Am 25.10.1944 wurde ich als Sohn des Lehrers Heinrich Blecher und seiner Ehefrau Margarete geb. Schulze in Lingen, Niedersachsen, geboren. Im Jahre 1949 siedelte ich nach Bielefeld um und besuchte dort von 1951 bis 1955 die Grundschule (Martinschule) und ab Frühjahr 1955 das Max-Planck-Gymnasium. Im März 1964 legte ich dort das Abitur ab.

Im April 1964 ging ich zur Bundeswehr, die ich im März 1966 als Leutnant der Reserve verließ.

Von April 1966 bis März 1968 war ich Apothekerpraktikant in der Löwen-Apotheke in Bielefeld; die Pharmazeutische Vorprüfung legte ich im März 1968 ab. Als vorexaminierter Apotheker arbeitete ich 6 Monate in der Niederwall-Apotheke in Bielefeld.

Im Oktober 1968 begann ich das Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg, das ich im Oktober 1971 mit der Pharmazeutischen Prüfung abschloß.

Im November 1971 siedelte ich nach Stuttgart über und begann unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.P.Pfaender am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim eine Dissertation mit dem Thema: "Entwicklung eines Peptid-Synthese-Verfahrens nach der NCA-Methode am polymeren Träger und Synthese der Teilsequenz 122-129 aus dem Lysozym". Im Oktober 1973 wurde ich zum Dr.rer.nat. promoviert.

Im Dezember 1971 heiratete ich Renate Petri, Apothekerin aus Stuttgart.

Nach meiner Promotion arbeitete ich noch bis März 1974 als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft in Stuttgart-Hohenheim.

Im April 1974 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Von März 1976 bis Februar 1977 führte ich am Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.F.Lingens den experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit aus.

Das Studium der Medizin schloß ich am 24.10.1979 mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.